

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ALAN COSTA SARCINELI SANTOS**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM**  
**SEMENTES DE *Carica papaya***

Vitória– ES

2013

ALAN COSTA SARCINELI SANTOS

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM  
SEMENTES DE *Carica papaya***

Dissertação apresentada ao Mestrado de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Machado Bueno Fernandes

Vitória– ES

2013

## DETIKATÓRIA

*“A Verdadeira viagem de descobrimento não consiste em  
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”  
(Marcel Proust)*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Henrique e Marlene, por representarem os pilares dos meus valores pessoais.

A minha esposa Vanessa pela paciência e incentivo e as minhas filhas Catherine e Gabriela, pelo sorrisos e abraços que foram fundamentais em momentos de cansaço.

A minha sogra Sandra e meu sogro Jayr, meu cunhado Jayr Filho e cunhada Cristiane, por se fazerem presentes em momentos jamais esquecidos.

Aos tios Carlinhos e Altair, por terem me recebido em sua casa.

Ao professor Antônio Alberto Fernandes, por ter me orientado e servido de exemplo na luta pela melhora desse país.

À professora Patricia, por ter me recebido em seu laboratório, onde foi realizado este trabalho e as reuniões de colegiado, que foram fundamentais na construção desta dissertação.

Ao ensino público de qualidade.

Aos amigos de Colatina e do Laboratório de Biotecnologia.

À CAPES pelo suporte financeiro deste trabalho.

A minha avó Laura, meu modelo de coragem.

# **EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM SEMENTES DE *Carica papaya***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração de Agronegócio.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Fernandes

Aprovada em 18 de abril de 2013.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Antônio Alberto Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

---

Prof(a) Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Coorientadora

---

Profa. Dra. Diolina Moura Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES  
Membro Interno

---

Prof. Dr. Aureliano Nogueira da Costa  
INCAPER – ES  
Membro Externo

Vitória – ES  
2013

*Dedico este trabalho a minha família e aos meus pais, que me fizeram não temer os obstáculos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Henrique e Marlene, por representarem os pilares dos meus valores pessoais.

A minha esposa Vanessa pela paciência e incentivo e as minhas filhas Catherine e Gabriela, pelo sorrisos e abraços que foram fundamentais em momentos de cansaço.

A minha sogra Sandra e meu sogro Jayr, meu cunhado Jayr Filho e cunhada Cristiane, por se fazerem presentes em momentos jamais esquecidos.

Aos tios Carlinhos e Altair, por terem me recebido em sua casa.

Ao professor Antônio Alberto Fernandes, por ter me orientado e servido de exemplo na luta pela melhora desse país.

À professora Patricia, por ter me recebido em seu laboratório, onde foi realizado este trabalho e as reuniões de colegiado, que foram fundamentais na construção desta dissertação.

Ao ensino público de qualidade.

Aos amigos de Colatina e do Laboratório de Biotecnologia.

À CAPES pelo suporte financeiro deste trabalho.

A minha avó Laura, meu modelo de coragem.

## RESUMO

O mamão (*Carica papaya*) origina-se da América tropical. O Brasil figura entre as principais produtoras mundiais, sendo que o estado do Espírito Santo figura como o maior exportador do país, a variedade do grupo Solo é mais cultivada, sendo que as plantações destinadas a exportação, prevalece a variedade *Golden* (JACOMINO, BROWN, KLUGE, 2003).

O Estado produz mais de 630.000 toneladas anuais, em aproximadamente, 7.900 ha. O cultivo gera uma renda bruta da ordem de R\$ 50 milhões por ano e emprega cerca de 9.000 pessoas no processo de produção e comercialização, durante todo ano, o que torna essa fruta, entre as mais importantes das exploradas no território capixaba.

Com o objetivo de avaliar a interferência do estresse abiótico por alta pressão hidrostática (HHP) sobre o metabolismo e o comportamento fisiológico de sementes de *Carica papaya*, conduziu-se o presente estudo, utilizando cultivar variedade *Golden* fornecidas pela INCAPER ao qual foram submetidas as pressões de 10, 20, 50, 200 e 400 MPa, comparadas com o controle à pressão ambiental de 0,1 MPa. Em experimentos conduzidos em condições controladas no laboratório de Biotecnologia aplicada ao agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo, o experimento demonstrou que o estresse por alta pressão hidrostática (HHP), alterou a capacidade de absorver água, verificada pela pesagem das sementes, hidratadas por 120 minutos, a capacidade de retenção hídrica, quando expostas a temperatura ambiente sobre bancada, entre 7 a 10 dias, a ferramenta interfere com retenção hídrica, hidratação, germinação e quebra de dormência. A investigação de alterações metabólicas ocorreu por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tendo como alvo a presença e a alteração da concentração de ácido abscísico (ABA), através da análise do gráfico originado pelo pico presente no cromatograma do HPLC, sendo que o material de análise foi o extrato recolhido após pressão hidrostática ou seja, água de hidratação dos lotes, presente na cápsula de



pressurização. Os dados foram submetidos à análise bioestatística, comparando-se as médias pelo Assistat.

Assim, o presente trabalho busca avaliar a resposta diferencial da variedade *Golden* de *Carica papaya* à HHP.

A pressão de 50 MPa foi a mais eficiente no quesito germinação, apresentando uma antecipação de 72 horas quando comparado ao grupo controle. Foi desenvolvido um protocolo de germinação de sementes de *Carica papaya* pós estresse por HHP e um novo protocolo para verificação da presença de fitormônios, proteínas, peptídeos e fenóis por HPLC pós HHP.

Palavras-chave: *Carica papaya*, ácido abscísico, alta pressão hidrostática, cromatografia líquida de alta eficiência.

## ABSTRACT

The *Carica papaya* originates from tropical America. Brazil is among the world's major producers, and the state of Espírito Santo figure as the country's biggest exporter, the variety of the group is more cultivated soil, and crops for export, a variety prevails Golden Land Group (Jacomino , BROWN, KLUGE, 2003).

The state produces more than 630,000 tons annually, approximately, 7,900 there. The cultivation generates a gross income of approximately \$ 50 million Porano and employs about 9,000 people in the production and marketing throughout the year, which makes this fruit, among the most important of the exploited in this state.

Aiming to evaluate the interference of abiotic stress by high hydrostatic pressure (HHP) on the metabolism and physiological seed *Carica papaya*, we conducted this study using cultivar Golden variety supplied by INCAPER which were subjected to pressures of 10 , 20, 50, 200 and 400 MPa, compared to the control subject to environmental pressure of 0.1 MPa. In experiments conducted under controlled conditions in the laboratory of biotechnology applied to agribusiness Federal University of Espírito Santo, the experiment demonstrated that the HHP, altered the capacity to absorb water, checked by weighing the seeds before and after stress HHP, hydrated for 120 minutes also showed changes in water retention capacity, when exposed to room temperature over bench, between 7 to 10 days, the tool stress by high hydrostatic pressure interferes with fluid retention, hydration, germination and breaking of dormancy. The investigation of metabolic changes occurred for high performance liquid chromatography (HPLC), targeting the presence and concentration change of abscisic acid (ABA), through an analysis of the graph originated by the peak present on the HPLC chromatograph, whereas the material Analysis of the extract was collected after hydrostatic pressure ie batches of water of hydration present in the capsule pressurization. The data were analyzed biostatistics, comparing the averages by Assistat.

Thus, this study seeks to assess the differential response of the Golden papaya variety to HHP.

A pressure of 50 MPa was the most efficient in the question germination, with an anticipation of 72 hours compared to the control group. We developed a protocol germinação seed *Carica papaya* after stress HHP and a new protocol for the presence of hormones, proteins, and phenols by HPLC pepetídeos post APH.

Key words: *Carica papaya*, abscisic acid, high hydrostatic pressure, high performance liquid chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa dos municípios que apresentam maior produtividade de <i>Carica papaya</i> no estado do Espírito Santo .....	21
Figura 2: Sistema indireto para aplicação de alta pressão hidrostática .....	25
Figura 3: Esquema de aplicação de estresse por alta pressão hidrostática .....	38
Figura 4: Montagem do cilindro de pressão hidrostática contendo a cápsula de pressão de polietileno .....	39
Figura 5: Semente de <i>Carica papaya</i> com raiz de 2 mm .....	41
Figura 6: Ganho de peso de sementes de <i>Carica papaya</i> após tratamento por alta pressão hidrostática (HHP) .....	45
Figura 7: Ganho de peso pós HHP.....	52
Figura 8: Ganho de peso dos experimentos .....	53
Figura 9: Respostas germinativas a 2, 4, 7 e 15 dias em sementes submetidas ao estresse e do grupo controle (0,1 MPa) .....	54
Figura 10: Sementes germinadas a 50 e a 400 MPa .....	59
Figura 11: Análise estatística das germinações de sementes de <i>Carica papaya</i> submetidas ao estresse por HHP e do grupo controle (0,1 MPa) .....	60
Figura 12: Cromatograma da água pressurizada e presença de ácido abscísico (ABA) submetidas a pressão do grupo controle (0.1 MPa) .....	64
Figura 13: Cromatograma da água pressurizada e presença de ABA em amostras a pressão de 0,1 MPa e a 0,1 MPa fortificadas com ABA industrial.....	65

Figura 14: Cromatograma da água pressurizada e presença de ABA em amostras submetidas a pressão de 50 MPa .....	65
Figura 15: Cromatograma ampliado da água pressurizada das amostras submetidas a pressão de 50 MPa .....	65
Figura 16: Cromatograma da água pressurizada e presença de ABA em amostras submetidas a pressão de 200 MPa .....	66
Figura 17: Imagem ampliada do perfil cromatográfico da água pressurizada e presença de ABA a 200 MPa... ..	67
Figura 18: Cromatograma da água pressurizada e presença de ABA em amostras submetidas a pressão de 400 MPa.....	67
Figura 19: Cromatograma da água pressurizada e presença de proteínas e peptídeos submetidas ao estresse pro HHP .....	69
Figura 20: Cromatogramas da água pressurizada por HHP em diferentes valores e verificação da presença de picos indicativos de fenol .....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Início e término do processo germinativo em sementes de <i>Carica papaya</i> submetidas ao estresse por HHP por 30 minutos .....	49
Tabela 2 - Percentual de germinação <i>in vitro</i> total verificado nas sementes submetidas ao estresse por Alta pressão hidrostática (HHP), após 15 dias de experimento, armazenadas em câmara de germinação com controle de umidade e temperatura, com fotoperíodo .....	50
Tabela 3 – Percentual germinativo das sementes submetidas ao estresse por HHP e do grupo controle (0,1 MPa) .....	61

## LISTA DE SIGLAS

ABA – Ácido abscísico

GA - Giberilina

MPa – Mega pascal

nm –Nnanômetro

HHP – Alta pressão Hidrostática

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta eficiência

UV-VIS – Ultravioleta e visível

BOD – Câmara de germinação

% G – Porcentagem de germinação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MAMÃO ( <i>CARICA PAPAYA</i> ) NO AGRONEGÓCIO MUNDIAL, BRASILEIRO E CAPIXABA. ....	18
1.2	ESTRESSE .....	22
1.3	ESTRESSE POR HHP .....	23
1.3.1	MECANISMO DE HHP .....	25
1.4	RESPOSTAS METABÓLICAS PÓS HHP .....	26
1.5	GERMINAÇÃO .....	27
1.6	GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MAMÃO SOB ESTRESSE ABIÓTICO	29
1.7	GERMINAÇÃO E HIDRATAÇÃO .....	30
1.7.1	EXIGÊNCIAS HÍDRICAS .....	30
1.7.2	RELAÇÕES HÍDRICAS DURANTE GERMINAÇÃO .....	31
1.7.3	ALTERAÇÕES METABÓLICAS POR HIDRATAÇÃO .....	32
1.7.4	ESTRESSE, HIDRATAÇÃO E RELAÇÃO ABA / GA .....	34
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1	GERMINAÇÃO .....	37
3.1.1	ASSEPSIA .....	40
3.1.2	GERMINAÇÃO PÓS HHP .....	40
3.1.3	GERMINAÇÃO IN VITRO .....	43
3.2	PROTOCOLO DE HIDRATAÇÃO .....	44
3.3	DETERMINAÇÃO DE ABA, PROTEINA, PEPTIDEOS E FENOL .....	46



3.3.1	PREPARO DAS AMOSTRAS P/ ANÁLISE POR HPLC .....	46
3.3.2	PRESENÇA DE ABA, PROTEÍNAS, PEPTÍDEOS E FENOL .....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1	EFEITO DE HHP SOBRE HIDRATAÇÃO E GERMINAÇÃO.....	49
4.2	HIDRATAÇÃO E GERMINAÇÃO .....	56
4.3	ANÁLISE DO FLUIDO DE TRANSFERÊNCIA DE PRESSÃO .....	63
4.3.1	ANÁLISE DE ABA.....	63
4.3.2	ANÁLISE DE PROTEÍNA E PEPTÍDEOS .....	68
4.3.3	ANÁLISE DE FENOL .....	70
4.4	ANÁLISE DA ÁGUA DE PRESSURIZAÇÃO .....	71
5	CONCLUSÃO .....	72
6	ANEXOS .....	74
7	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	99

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) NO AGRONEGÓCIO MUNDIAL, BRASILEIRO E CAPIXABA.

O Brasil é o primeiro produtor mundial de mamão, com uma produção de 1.650.000 t/ano, sendo um dos principais países exportadores para o mercado europeu e mundial. O fruto é cultivado em quase todo território brasileiro, mas merece destaque o estado do Espírito Santo.

A fruticultura brasileira apresenta uma relevante importância sócio econômica empregando 5,6 milhões de pessoas, 27% da mão-de-obra agrícola do país, além de estar fundamentada em pequenas e médias propriedades (FAO, 2012).

O mercado mundial de frutas, em 2005, aponta para cifras superiores a US\$ 31,5 bilhões/ano e cresce à taxa de 5% ao ano, sendo constituído, em sua maior parte, por frutas de clima temperado, típicas da produção e do consumo no hemisfério norte (FAO, 2012).

A importância sócio econômica do mamoeiro está em ser uma cultura de ciclo mais curto quando comparada a outras frutíferas como graviola, citros e goiaba, proporcionando um rápido retorno do capital investido e um maior rendimento por área, aproveitando a mão de obra familiar, uma vez que a renovação dos pomares se dá a cada dois anos, além de produzir o ano inteiro, absorvendo mão de obra constante, (SILVA et al. 2007)

A fruticultura brasileira encontra-se em expansão e sua receita já atinge 11,7% do valor total alcançado pela agricultura. Entre as 64 culturas investigadas, 22 são frutíferas, que foram cultivadas em uma área de 3.016.858 hectares, gerando uma receita de 17,4 bilhões de reais, 4,8% a mais que em 2007. Esta receita representa 11,7% do valor total alcançado pela agricultura em 2008. Os produtos que mais

contribuíram para este aumento foram a banana, com um acréscimo de 8,8% no seu valor de produção, o abacaxi (9,2%), a maçã (5,1%), o coco-da-baía (29,1%) e o mamão (14,2%) (IBGE , 2008).

A fruticultura capixaba também registrou números expressivos para a agricultura, ao corresponder com 17% do Valor Bruto da Produção Agropecuária do Estado no ano de 2009. Ao todo, são 85 mil hectares ocupados com o plantio de frutas, que garantem uma produção anual de 1.3 milhões de toneladas, gerando R\$ 600 milhões em renda e 57,5 mil empregos diretos no processo de produção, sendo a banana, o maracujá e o mamão as maiores culturas geradoras de emprego (SEAG, 2009).

Dentre os maiores produtores de mamão do mundo a Índia se encontra em primeiro lugar com a produção correspondente a 30% do total mundial, seguido do Brasil 21,1%, Nigéria 8,5%, Indonésia 7,2% e México 7,1% (FAO, 2008). Estes dados mostram que o Brasil junto com a Índia produziram nesse ano uma quantidade de frutos superior à soma de todos os outros países do mundo. No entanto devido à alta exigência do mercado externo apenas 1,7% da produção brasileira foram exportadas, sendo superada por México e Belize (FAO, 2012).

As variedades mais cultivadas são no Espírito Santo, são do grupo Solo e os híbridos do grupo Formosa, sendo que nas plantações brasileiras para exportação prevalece a variedade Golden do grupo Solo (JACOMINO, 2003).

No Brasil os Estados da Bahia (902.525 t), Espírito Santo (630.124 t) e Rio Grande do Norte (106.064 t) são os maiores produtores nacionais. Apesar de a Bahia ser o principal produtor do país o Espírito Santo é o maior exportador nacional de mamão, correspondendo a cerca de 50% do total em peso das exportações brasileiras do fruto (BRAPEX, 2013).

O Espírito Santo é o maior produtor brasileiro em produção relativa por área plantada, com uma produção de 424,6 mil toneladas em 5,9 mil há.

No Espírito Santo a cultura está localizada na região Norte do Estado, cujas condições climáticas, bem como a alta tecnologia empregada na sua exploração, permitem os maiores índices de produtividade do país (MARTINS, 2003), cerca de

30% maior do que a do segundo colocado (IBGE, 2008b). Além disso, nessa região os frutos possuem um alto padrão de qualidade, com grande aceitação pelos mercados consumidores locais e internacionais ( MARTINS & COSTA,2003).

O clima predominante na região é o tropical úmido , com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A precipitação pluviométrica varia de 1.000 a 1.200 mm anuais. A temperatura média da região situa-se entre 22 e 24°C, com amplitude anual não ultrapassando a 5°C (FAGUNDES & YAMANISHI, 2001).

A região produtora de mamão caracteriza-se por ser uma região de solos arenosos e a temperatura média da região normalmente situa-se dentro da faixa ótima para o desenvolvimento da cultura. Porém com a má distribuição de chuvas onde se tem até oito meses no ano em que a evapotranspiração mensal é menor que a precipitação mensal, torna-se obrigatório o uso da irrigação nas lavouras comerciais.

A região é composta pelos seguintes municípios capixabas: Linhares, São Mateus, Jaguaré, Sooretama, Pinheiros e Aracruz. A região tem por cidade de referência Linhares e três empresas âncoras: a Caliman Agrícola S.A., a Gaia Importação e Exportação Ltda e Agra Produção e Exportação Ltda (SERRANO & CATTANEO, 2010).

# ESPÍRITO SANTO MUNICÍPIOS



Figura 1. Mapa demonstrativo da região produtora de Carica papaya no Espírito Santo. INCAPER em Revista, Ano 1, no 1, 2010

## 1.2 ESTRESSE

Os organismos vivos mantêm um complexo equilíbrio interno, que os possibilita controlar seu crescimento e executar suas funções biológicas porém, flutuações nas condições ambientais podem afetar esse equilíbrio que é indispensável para a existência da vida. O estresse consiste nas perturbações internas ou externas que desestabilizam a dinâmica de crescimento de um organismo. O estresse é um fenômeno limitante na vida dos seres vivos, porém, os organismos não são passivos às situações estressantes, eles evoluíram fisiologicamente e geneticamente para se protegerem e sobreviverem a flutuações na temperatura, osmolaridade, acidez, radioatividade, altas concentrações de substâncias tóxicas e ausência de nutrientes.

A resposta a uma situação de estresse não depende apenas das mudanças na fisiologia e bioquímica interna da célula, elas dependem também da velocidade com que a nova perturbação é percebida e interpretada (GASH et al., 2000).

Vários artigos demonstraram que o tratamento prévio com uma ferramenta de estresse, podem ocasionar, destruição, ou servir de estímulo para a expressão de fatores de proteção, esse tipo de estresse que não destrói, também é conhecido como estresse sub-letal, que até pode aumentar a sobrevivência (BENJAPHOKEE et al., 2012). Esse interessante fenômeno é real para várias situações estressantes, e é conhecido como, proteção cruzada (DRAUZIO, 2010). Em trabalhos prévios foi demonstrado que células ou genes submetidas ao estresse subletal, tratadas previamente com  $H_2O_2$ , etanol e baixas temperaturas, sobreviveram e tornaram-se mais resistentes aos tratamentos com a alta pressão hidrostática, e que células pré-tratadas com valores baixos de pressão hidrostática, apresentaram maior sobrevivência, quando submetidas a valores de pressão letais (PALHANO et al., 2009). Essas observações sugerem que existam mecanismos de resposta ao estresse que são comuns a vários tipos de perturbações, e que existe uma pré-ativação de componentes importantes para a resposta a outros estresses posteriormente aplicados (SOUZA et al., 2013).

Os seres vivos passam constantemente por diversas situações de estresses e modulam respostas de defesa, com o objetivo de supera-los, e retomar o

metabolismo normal. Saber como os vegetais se protegem é essencial para obter, através da bioengenharia, variedades agrícolas mais resistentes, o que pode aumentar a produção e a qualidade das plantas. Por isso, diversos grupos de pesquisa buscam definir o papel de cada substância participante dos processos bioquímicos relacionados a defesa das plantas. Existem diversas peças envolvidas na indução de resposta de defesa vegetal contra muitos estresses bióticos e abióticos que merecem ser averiguadas. Por esse motivo é muito interessante que a biotecnologia utilize ferramentas de estresse, como a (HHP) e em várias aplicações biotecnológicas, com o objetivo de modular respostas fisiológicas de interesse ao agronegócio (SHINAGAWA, 2009).

### **1.3 ESTRESSE POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Várias são as aplicações da alta pressão hidrostática (HHP), entre essas aplicações destacamos a descontaminação de alimentos (TAUSCHER, 1995), inativação de microrganismos (SATILMIS; SENCER, 2011), mudanças na cinética e função de enzimas (BANG; CHUNG, 2010) e produção de vacinas (SHEARER; KNIEL, 2009). Além dessas utilidades, a alta pressão hidrostática tem sido utilizada como um importante modelo do estudo da resposta ao estresse, indicando linhagens de leveduras com importantes características industriais (BRAVIM et al., 2010)

A HHP ferramenta utilizada para essa dissertação, baseia-se em dois princípios, o princípio de L<sup>ê</sup> Chatelier, o qual estabelece que a velocidade de uma reação química, transição de fase e mudança de conformação molecular, por exemplo, dependem da pressão e do volume, por isso, quanto menor o volume, mais favorável e rápida será a reação devido ao aumento de pressão (YUSTE et al., 2001). O segundo é o princípio de Pascal, ou isostático que se refere à transmissão de pressão uniforme e instantânea em todo o produto, independente da forma e do volume, isto mostra que a pressão aplicada e o tempo de aplicação dependem do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado (SMELT, 1998; YUSTE et

al., 2001). Assim, o produto não fica deformado, mesmo estando em pressões relativamente altas (YUSTE et al, 2001).

O sistema completo de aplicação de pressão hidrostática consiste num vaso de pressão, gerador de pressão, fluido condutor de pressão, dispositivo de controle de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto (ROSENTHAL, 2008).

O coração do sistema é o vaso pressurizado que é, em muitos casos, simplesmente um vaso cilíndrico, construído de aço de baixa liga e de alta força de tensão. A espessura da parede do vaso é determinada pela máxima pressão de trabalho, pelo diâmetro do vaso e pelo número de ciclos para o qual o vaso é designado.

O fechamento do vaso pode ser realizado por diferentes mecanismos, dependendo da aplicação a que se destina. Após o carregamento e fechamento da câmara de pressão, adiciona-se o meio de pressurização. A água tornou-se o principal fluido a ser utilizado como meio de transmissão de pressão, pois possui baixa compressibilidade e maior compatibilidade com o alimento, ocasionando menor risco de contaminação. Após a adição da água, aplica-se a pressão sobre ela. (FARKAS; HOOVER, 2000).

Como a água é o principal ingrediente de muitos alimentos, a compressão de muitos produtos exhibe aquecimento adiabático muito similar ao que ocorre com a água, então, mesmo sob condições de altas pressões a elevação da temperatura é relativamente baixa, por isso a água é o principal meio de pressurização (TING; BALASUBRAMANIAM, 2002).

As embalagens utilizadas na HHP devem ser flexíveis, pois o material tem seu volume reduzido em 15% durante a pressurização, e expansão equivalente durante a despressurização. Assim, estas devem ter capacidade de redução e expansão sem perda da integridade do material e da selagem utilizada (FARKAS e HOOVER, 2000). *Stomacher bags*, tubos estéreis, tubos e recipientes de polietileno são exemplos de embalagens utilizadas nessa técnica (BRAVIM et al., 2010).



### 1.3.1 MECANISMO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Segundo CÁNOVAS-BARBOSA et al. (1999) a alta pressão pode ser gerada das seguintes maneiras:

a) Compressão direta: é gerada por pressurização de um meio com a parte final de um pistão de diâmetro pequeno. O diâmetro grande do final do pistão se move com uma bomba de baixa pressão. Este método de compressão direta permite uma compressão muito rápida, porém as limitações do fechamento dinâmico de alta pressão entre o pistão e a superfície interna da câmara restringem o uso deste método a diâmetros pequenos de laboratório, (CÁNOVAS-BARBOSA et al., 1999).

b) Compressão indireta: utiliza um intensificador de alta pressão para bombear o meio de pressão de um depósito em direção a câmara de pressão fechada até que se alcance a pressão desejada (CÁNOVAS-BARBOSA et al., 1999).

O laboratório de Biotecnologia no qual esse experimento foi realizado, utiliza como método gerador de alta pressão hidrostática (HHP), a compressão indireta, (Figura 2).

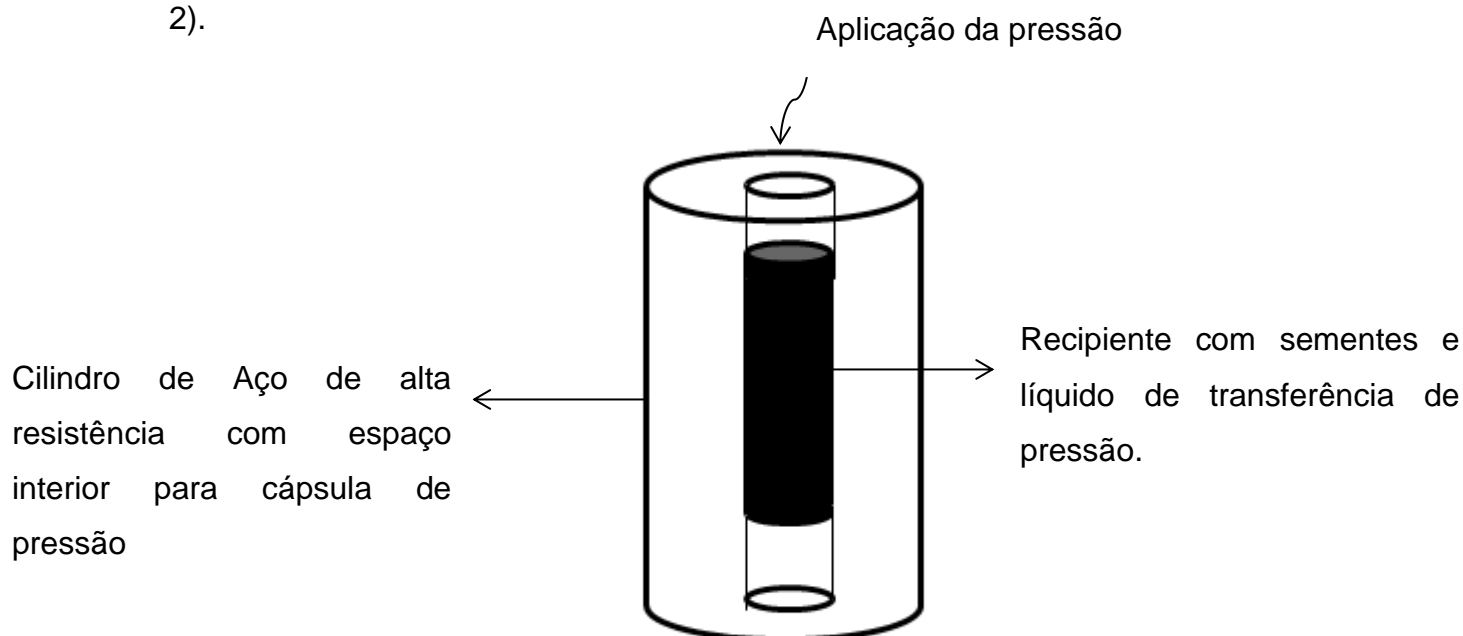


Figura 2. Sistema indireto de aplicação de HHP

Independentemente do sistema a parte mais importante é o recipiente, pois é ele que suporta toda a pressão aplicada no processo. Os recipientes são fabricados a partir de um bloco de liga de aço, com capacidades de suportar diferentes pressões. O sistema gerador de pressão causa um leve aumento da temperatura do material utilizado (MERTENS e DEPLACE, 1993).

#### **1.4 RESPOSTAS METABÓLICAS PÓS HHP**

Na categoria de pressão estática, a pressão hidrostática é considerada uma pressão isostática, em que os valores de pressão são os mesmos em todas as direções do espaço (NOLWENNIG; JEAN, 2002).

O ambiente em que nós humanos vivemos, possui valor de pressão de, aproximadamente, 1 atmosfera, o que equivale a 0,1 MPa. Porém, a maioria da nossa biosfera é composta por locais onde os valores de pressão são extremamente elevados. Nesses locais, podemos encontrar organismos piezófilos ou barófilos, resistentes a altas pressões, que geralmente suportam ambientes como o fundo oceanico, que em determinados ponto apresenta pressões que excedem 38 MPa .

Sobreviver em ambientes com valores de pressão elevados implica em drásticas mudanças na fisiologia e bioquímica dos organismos. A alta pressão hidrostática diminui o volume de reação das células, o que leva a alteração de diversos componentes celulares de maneira a favorecer conformações mais compactas (MENTRÉ et al., 1999).

Componentes como a membrana plasmática sofrem compactação em seus lipídeos, principalmente, nos lipídeos próximos a proteínas que estão inseridas na membrana (REYES; TAUC, 1993).

Esse fenômeno contribui para uma maior fluidez e aumento na espessura da membrana. Essas mudanças também afetam a difusão de moléculas pela membrana e comprometem a função das proteínas membranares. Já foi demonstrado que algumas proteínas podem sofrer mudanças conformacionais e

funcionais quando submetidas a pressões menores que 200 MPa (MOLINA; SANZ, 2002)

A estrutura lipídica de uma célula é o componente mais sensível a ação da alta pressão hidrostática (WINTER; JEWORREK, 2009). A diminuição da fluidez das células causada pelo piezotratamento já foi relacionada com a sensibilidade ao tratamento com a alta pressão hidrostática (YALDAGARD et al., 2008). O piezotratamento (HHP), pode modificar o aspecto das membranas de líquido-cristalino para um aspecto gelatinoso. Sendo que os organismos que vivem em altas pressões hidrostáticas tendem a apresentar membranas mais fluidas. Essa fluidez é parcialmente um reflexo do aumento da taxa de lipídios insaturados em suas membranas (WINTER; JEWORREK, 2009).

A alta pressão induz a germinação dos esporos, e a subsequente pressão e temperatura atuam sobre os esporos germinados, destruindo-os (PALHANO, F. L. et., al. 2004)

## **1.5 GERMINAÇÃO**

Para que exista germinação, a semente deve dispor de condições favoráveis ao restabelecimento do metabolismo, caracterizando o processo germinativo, sendo o fator hidratação, determinante segundo (MATEUS et al., 2010).

Para uma semente viável germinar, certas condições devem ser favoráveis: fornecimento adequado de água, temperatura desejável, certa composição de gases na atmosfera, luz (certas sementes) e ausência de inibidores da germinação, as duas primeiras condições são os fatores mais cruciais (LORENZ, 1980).

A germinação é um processo que envolve tanto reações catabólicas, como a degradação de substâncias de reservas, quanto reações anabólicas na produção de novas células e organelas do embrião (METIVIER, 1979).

A semente madura e seca (como a que foi sedida pela Embrapa), em estado de quiescência, caracteriza-se pelo baixíssimo nível de atividades metabólicas. Para que a semente abandone este estado e inicie sua germinação, ela passa por um estado de latência. Este consiste fundamentalmente pela reidratação, em que ocorre a embebição de água pelas células do embrião e endosperma; formação e liberação de enzimas, com a reativação das organelas celulares e macromoléculas e metabolismo das substâncias de reserva, com geração de energia metabólica através do sistema citocromo, levando, ao crescimento e divisão da célula (MEREDITH & POMERANZ, 1985 ).

O processo de embebição caracteriza-se pelo aumento do volume da semente (o volume de água absorvida é grande em relação ao peso da matéria seca da semente), desenvolvimento de considerável pressão, que é acompanhada pela liberação de calor durante o início da absorção de água (é um processo exotérmico) e o volume final é menor que a soma dos volumes originais da água e da semente. A embebição diminui com o aumento da concentração do soluto na água, devido a efeitos osmóticos. Isto é devido principalmente às proteínas que absorvem a água durante a germinação. A celulose também pode contribuir para o entumescimento, enquanto o amido não tem efeito. A embebição de água pelas sementes reflete em alguma extensão a composição da semente (POPINIGIS, 1985).

O aumento do volume da semente, resultado da entrada de água pela processo de hidratação, provoca a ruptura do tegumento de revestimento, o que disponibiliza entrada do oxigênio necessária para restabelecimento dos tecidos da raiz primária (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000)

O suprimento de oxigênio é limitado pelas condições de umidade, uma vez que o excesso de água limita a disponibilidade de oxigênio (POLLOCK, 1974)

Durante a germinação e o crescimento da semente (como a de *Carica papaya*), o embrião altera sua produção de fitormônios. Esses, por sua vez, induzem o desenvolvimento de enzimas hidrolíticas. Importantes enzimas que participam na degradação das reservas que se encontram no endosperma. Os primeiros dois dias que antecedem a germinação coincidem com o máximo movimento de giberelinas

do embrião para a aleurona, e por isso a manutenção da umidade é essencial (MEREDITH & POMERANZ, 1985).

A hidratação é fundamental para o processo de absorção de água das sementes, assim como observado por POSSE et al. (2001). A literatura registra que esse período é caracterizado por iniciar o processo metabólico, como no aumento do processo respiratório, umidade, atuação de enzimas envolvidas em processos anaeróbicos, estruturação do sistema de membranas, síntese de peptídeos e ativação de ácidos nucléicos (MARCOS FILHO 2005).

Os experimentos in vitro, realizados pelo laboratório de biotecnologia / UFES (ABREU, 2011), tem sido usados condições ideais de germinação pré-determinados. Assim, pode-se escolher as condições desejadas, como realizar pré-tratamento ou não, utilizar o processo de germinação entre papéis, em placas de Petri ou em bacias/bandejas; ou ainda realizar secagem em diferentes temperaturas.

## **1.6 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MAMÃO SOB ESTRESSE ABIÓTICO**

A germinação de sementes de mamão freqüentemente é lenta e irregular (CHACKO & SINGH, 1966).

As plantas estão submetidas a uma grande variedade de estresses ambientais que alteram seu metabolismo e desenvolvimento, e induzem uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular (FLOWERS et al., 2000; ZHU, 2002).

A sarcotesta, presente nas sementes do mamão, pode atuar impedindo a germinação, devido à presença de inibidores (REYES et al., 1980 e CHOW & LIN, 1991), também, é observada dormência, em sementes desprovidas de sarcotesta (VIGGIANO et al., 2000).

Várias tentativas têm sido realizadas para superar a dormência pós-colheita e melhorar a germinação de sementes de *Carica papaya*. Alguns experimentos, utilizaram a remoção da sarcotesta, envelhecimento acelerado, embebição em

presença de giberelina (VIGGIANOET al., 2000), outros, fizeram uso de fatores bióticos e abióticos. O objetivo principal dos tratamentos foi interferir no desenvolvimento e na produtividade do mamão, buscando contribuir para o crescimento da produção.

Os estresses abióticos tais como o frio, a seca, a salinidade, o choque térmico e o alagamento são fatores ambientais que limitam o crescimento vegetal e a produtividade de culturas de interesse agrônômico, sendo que a seca e a elevada salinidade constituem-se os mais limitantes (BOYER, 1982; LAWLOR E COMIC, 2002; HMIDA-SAYARIET al., 2005).

## **1.7 GERMINAÇÃO E HIDRATAÇÃO**

### **1.7.1 EXIGÊNCIAS HÍDRICAS**

O mamoeiro é uma planta bastante exigente em água, sendo sua média de consumos anual entre 1200 e 3125 mm, dependendo das condições climáticas. A ocorrência da má distribuição das chuvas na região torna obrigatório o uso da irrigação nas lavouras comerciais do mamoeiro (SANCHES & DANTAS, 1999).

Os efeitos benéficos da pré-embebição em água pode ter desencadear o processo de germinação em sementes. Segundo AKERS et al. (1987) e PILL & FINCH-SAVAGE (1988) o efeito benéfico da hidratação das sementes é devido em grande parte à remoção de inibidores de germinação.

A água é essencial para ativação de enzimas, quebra de ligações químicas, translocação e uso de substâncias armazenadas (BRADFORD, 1994; COPELAND E MACDONALD, 1995), a dinâmica da absorção de água interfere na velocidade das reações bioquímicas, além dos processos fisiológicos que governam a germinação (POPINIGIS, 1985; CARVALHO E NAKAGAWA, 2000).

De forma geral, sementes de grande número de espécies tropicais e subtropicais germinam na faixa entre 20°C a 30°C (BORGES E RENA, 1993).

A água é a principal responsável pela restrição, muitas vezes, do crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais nas diferentes regiões geográficas (VOET & VOET, 2004).

A água é o fator que mais influencia o processo de germinação das sementes, sendo que, dentro de determinadas proporções, quanto maior a sua disponibilidade para as sementes, mais rápido é o processo de embebição (CARVALHO & NAKAGAWA, 1983).

### **1.7.2 RELAÇÕES HÍDRICAS DURANTE A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES**

A hidratação das sementes é influenciada por três fatores principais: 1) natureza do material de reserva da semente, 2) diferença do potencial de hidratação entre a semente e o meio, e 3) temperatura do ambiente. Estes fatores influenciam, principalmente, a velocidade de embebição e, conseqüentemente, a velocidade de germinação das sementes (BEWLEY & BLACK, 1994)

No processo de embebição e germinação de sementes, a água é o principal agente estimulador e controlador, pois proporciona amolecimento do tegumento, acréscimo no volume do embrião e dos tecidos de reserva, aumento nos estímulos à digestão, à translocação e à assimilação dos nutrientes, com conseqüente crescimento do eixo embrionário (VILLELA, 1998).

### 1.7.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS POR HIDRATAÇÃO DE SEMENTES

Embora as sementes maduras estejam metabolicamente em latência, a retomada do metabolismo durante a germinação começa em alguns minutos após o contato da semente seca com a água (KERMODE, 1995). Isto acontece devido ao fato de que as enzimas e metabólitos exibem suas funções somente após a hidratação do meio em que estão (VOET & VOET, 2004). Desta forma, a retomada metabólica se utiliza da estrutura e dos componentes enzimáticos pré-existentes nas sementes, que foram conservados durante o período de quiescência (BEWLEY et al., 2000).

Os efeitos positivos da hidratação na porcentagem e na velocidade de germinação tem sido comprovado em pesquisas com várias espécies de plantas, cuja impermeabilidade do envoltório se constitui numa restrição à germinação. Nestas, a permanência das sementes em água, por determinado período de tempo, variável com a espécie, pode ajudar a tornar o envoltório mais permeável à água. A pré-embebição das sementes em água para acelerar a germinação tem sido adotada especialmente para espécies que têm longo período de germinação, buscando reduzir o tempo médio necessário para este processo (FERREIRA & GENTIL, 2006).

Como exemplo da ação da hidratação, FERREIRA & GENTIL (2006) verificaram aumento no percentual de germinação de sementes de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) de 58% para 70% quando essas foram submetidas a 9 dias de embebição em água.

BEZERRA et al., 2006 observaram que a velocidade de germinação das sementes aumentaram linearmente com o tempo de embebição.



#### 1.7.4 ESTRESSE, HIDRATAÇÃO E RELAÇÃO ABA / GIBERELINA

O ABA atua na inibição da germinação precoce, indução da síntese de proteínas de reserva e dormência. Os níveis de ABA geralmente são elevados nos estágios iniciais do desenvolvimento e decrescem durante a maturação do embrião (ROCK & QUATRANO, 1995).

O ácido abscísico é um fitormônio encontrado em todas as plantas vasculares, sendo também detectado em musgos. É encontrado na maioria dos tecidos vegetais e sintetizado em todas as células que possuem cloroplastos (TAIZ; ZEIGER, 2004). É um hormônio de extrema importância, pois está relacionado com a regulação de vários processos celulares, tais como a superação da dormência de sementes, transição do estado embrionário para o estado de dormência e crescimento vegetativo, além de exercer funções nas respostas a estresses abióticos e bióticos.

O ácido abscísico é também o principal responsável pelo fato das sementes não germinarem imediatamente após serem produzidas, fenômeno conhecido como dormência. Em certas plantas de regiões áridas, por exemplo, as sementes só germinam após serem lavadas por uma chuva, que remove o excesso de ácido abscísico nelas presente. Na maioria dos casos, é a relação entre as quantidades de ácido abscísico e de giberelina que determina se a semente irá continuar em dormência ou se ela começará a germinar (DE MELO, 2012).

O ABA está intimamente relacionado com a tolerância a várias condições de estresse (choque térmico, seca, salinidade e frio) e a alteração dos padrões de expressão gênica durante o estresse.

O ácido abscísico é muito importante, pois além de funções de regulação nos processos fisiológicos e de desenvolvimento, é o principal regulador nas respostas adaptativas a estresses ambientais, sobretudo a seca (JIANG E ZHANG, 2002).

Segundo FOUNTAIN & BEWLEY (2001), que trabalharam com sementes de alface, a relação entre giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA) é determinante no processo de germinação de sementes, onde valores elevados entre GA/ABA favorece a

germinação, enquanto que baixas valores inibem a germinação (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A germinação é um processo complexo e organizado, é essencial no ciclo de vida dos vegetais. Este processo pode ser dividido em duas etapas principais: a primeira caracterizada pela divisão celular e diferenciação do embrião, e a segunda caracterizada pela maturação do embrião. Nesta última etapa ocorre o acúmulo dos principais compostos de reserva e a preparação do embrião para a tolerância à desidratação, dormência e germinação (SALLANDROUZE et al., 2002).

Entre os vários fatores que interferem o processo de embriogênese destacam-se os hormônios vegetais, que atuam na regulação e expressão de múltiplos genes durante o desenvolvimento do embrião (CHIWOCHA & VONADERKAS, 2002).

A ação da giberelina (GA) e do ácido abscísico (ABA) na germinação de sementes esta relacionado a hidratação e tolerância a dessecação. A GA tem a sua produção estimulada com o aumento da hidratação, uma vez que o gene responsável por sua produção e ativação, favorece a produção de enzimas hidrolíticas (amylase, poligalacturonase, celulase, arabinosidase, expansina) que quebram reservas do endosperma durante a germinação, enfraquecendo os tecidos circunvizinhos que cobrem ao embrião, facilitando a germinação (DE ALMEIDA GUIMARÃES, 2008).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste experimento foi verificar a resposta metabólica e fisiológica de sementes de *Carica papaya*, submetidas ao estresse por alta pressão hidrostática.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar a interferência do estresse por HHP na capacidade da semente de absorver e manter sua hidratação.

Analisar a capacidade de germinação após o estresse por HHP.

Comparar os níveis de ácido abscísico (ABA), e possíveis alterações moleculares induzidas por estresse por alta pressão hidrostática (HHP), como proteínas, aminoácidos e fenóis, analisados por HPLC.

Validar um tratamento analítico para determinação de compostos presentes na água utilizada como meio de transferência de pressão no estresse por HHP.

Análise estatística da capacidade de hidratação e germinação das sementes submetidas a HHP e do grupo controle de sementes a hidratadas e germinadas a pressão ambiental.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), utilizando-se sementes de *Carica papaya*, cedidos pela INCAPER.

As sementes seguiram rotina para preparação das sementes do Laboratório de biotecnologia / UFES, sendo submetidas à fricção em peneira de arame com auxílio de uma escova de cerdas plásticas, sob jato de água corrente, para a remoção dos resquícios da sarcotesta, sendo, em seguida, colocadas para secar sobre papel toalha. Foram obtidas, então sementes sem sarcotesta que foram submetidas aos tratamentos para superação da dormência, retenção hídrica, ganho de peso, germinação e velocidade de germinação discriminados a seguir.

O experimento realizou um protocolo para verificação do efeito do HHP sobre a germinação de sementes de *Carica papaya*, analisando dormência, germinação, hidratação, tempo de retenção hídrica e velocidade de germinação e outro protocolo para determinação de alterações moleculares quantificáveis por HPLC.

O experimento foi realizada com 1.800 sementes selecionadas ao acaso.

Foram realizados trinta e seis tratamentos, cujos resultados foram utilizados em triplicata para realização de doze ensaios. Sendo seis ensaios (cinco tratamentos por HHP e o grupo controle) utilizados para verificação da germinação e outros 6 ensaios (cinco tratamentos por HHP e o grupo controle) utilizados para verificação da influência da alta pressão hidrostática sobre o processo de hidratação das sementes de *Carica papaya*.

### 3.1 GERMINAÇÃO

O processo de germinação ocorreu *in vitro*, sendo utilizada placas de petri e gaze esterilizados em autoclave e UV respectivamente. Onde as sementes foram inicialmente postas sobre gaze previamente umidecida com 2 ml de água destilada, cobertas com gaze umidecida com 1,5 ml de água destilada e postas a germinar.

Foram realizados seis experimentos, relacionados ao estudo comparativo da aplicação da HHP com o grupo controle, sendo as pressões do experimento equivalentes aos valores de 10, 20, 50, 200 e 400 MPa, sendo o controle a pressão de 0,1 MPa, cada experimento foi repetido em triplicata.

Para o desenvolvimento dos experimentos foram colocadas três amostras de 50 sementes para germinar em gaze, na forma de rolo, a temperatura de 25 °C, mantidos em câmara de germinação (BOD).

As sementes passaram por assepsia utilizando solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 30 minutos e, em seguida, foram lavadas em água corrente por cinco minutos e água destilada por dois minutos.

Afim de encontrar o limite máximo de tolerância à HHP, inicialmente os lotes foram submetidos a diversos níveis de pressão, com valores abaixo e acima de 50 MPa, pressão essa que apresentou melhores resultados, até que os testes estatísticos encontrassem significância entre os valores experimentados.

As sementes foram submetidas a 6 tratamentos de estresse por HHP em prensa hidráulica manual, acondicionadas em cápsula de polietileno, com água destilada suficiente para completar o volume do recipiente de polietileno, ao qual foi inserida em cápsula de pressão forjada em aço inoxidável de alta dureza e submetidas ao HHP durante 30 minutos, um lote de sementes não pressurizado foi utilizado como controle.

O delineamento experimental com HHP, procedeu-se da seguinte forma: (1) 10 MPa; (2) 20 MPa; (3) 50 MPa, (4) 200 MPa e (5) 400 MPa (Figura 3)

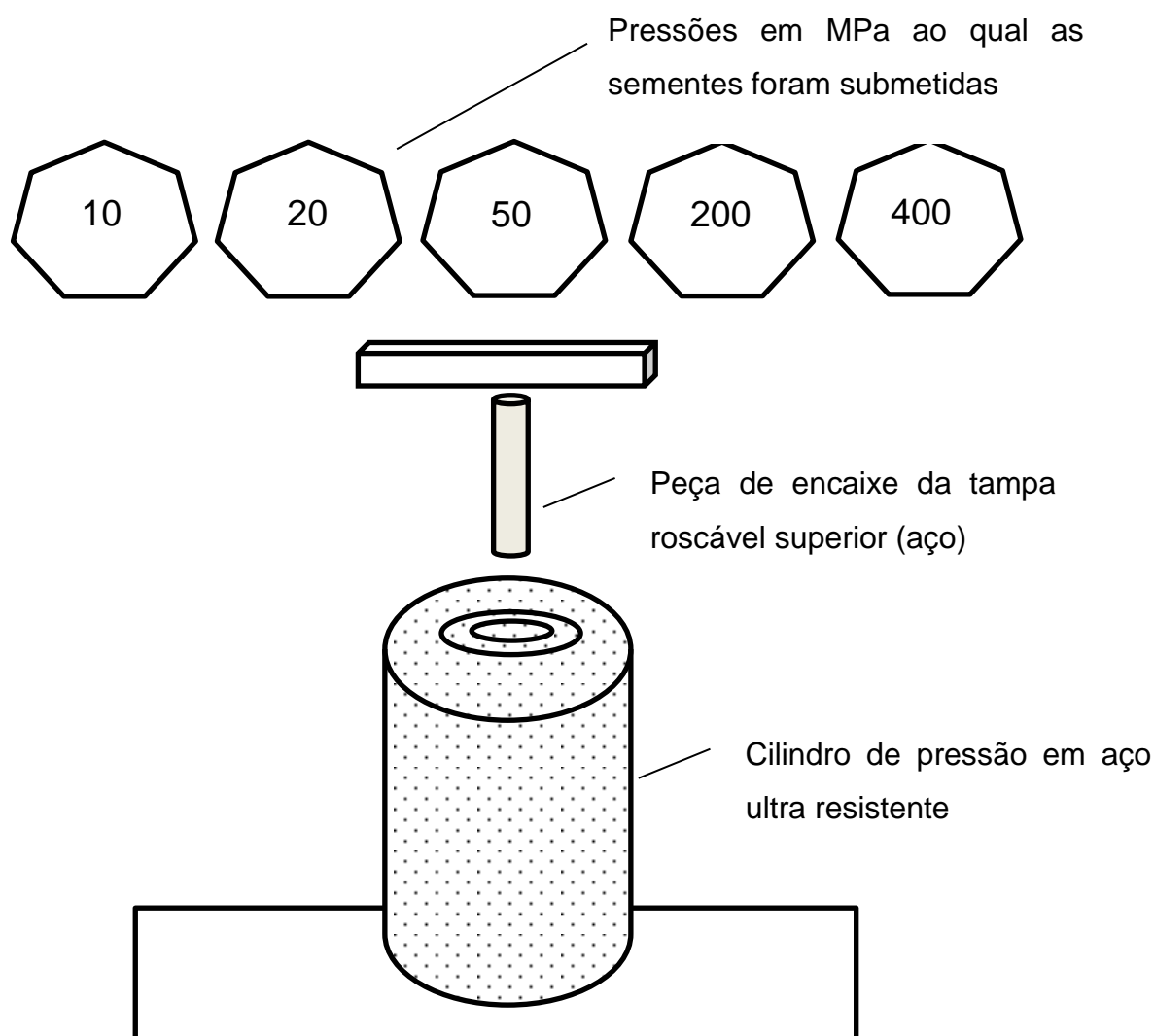


Figura 3. Esquema de aplicação de Alta pressão hidrostática.

No procedimento para o tratamento com pressão, as amostras foram colocadas em um tubo de polietileno de 7 ml e pressurizadas na ausência de ar à temperatura ambiente. O aparato para aplicação de alta pressão hidrostática utilizado neste trabalho é uma adaptação de uma célula de pressão fabricada em aço de alta dureza desenvolvida por E. S. Itskevich, em 1962, no “Institute for High Pressure Physics of the Russia Academy of Science” (Figura 4). Esta célula está desenhada para pressurização de amostras em um meio fluido através de um pistão cilíndrico de aço. Um manômetro digital foi utilizado para medir a pressão. A vantagem desta

montagem é que após a pressurização, um conjunto de engrenagens mantém a pressão aplicada e a unidade pode ser removida.

As sementes de *Carica papaya* foram submetidos as pressões de 10, 20, 50, 200 e 400 MPa, através de um sistema de prensa, onde um pino de aço se encaixa na tampa roscável superior, e a pressão é mantida através de um sistema de roscas.

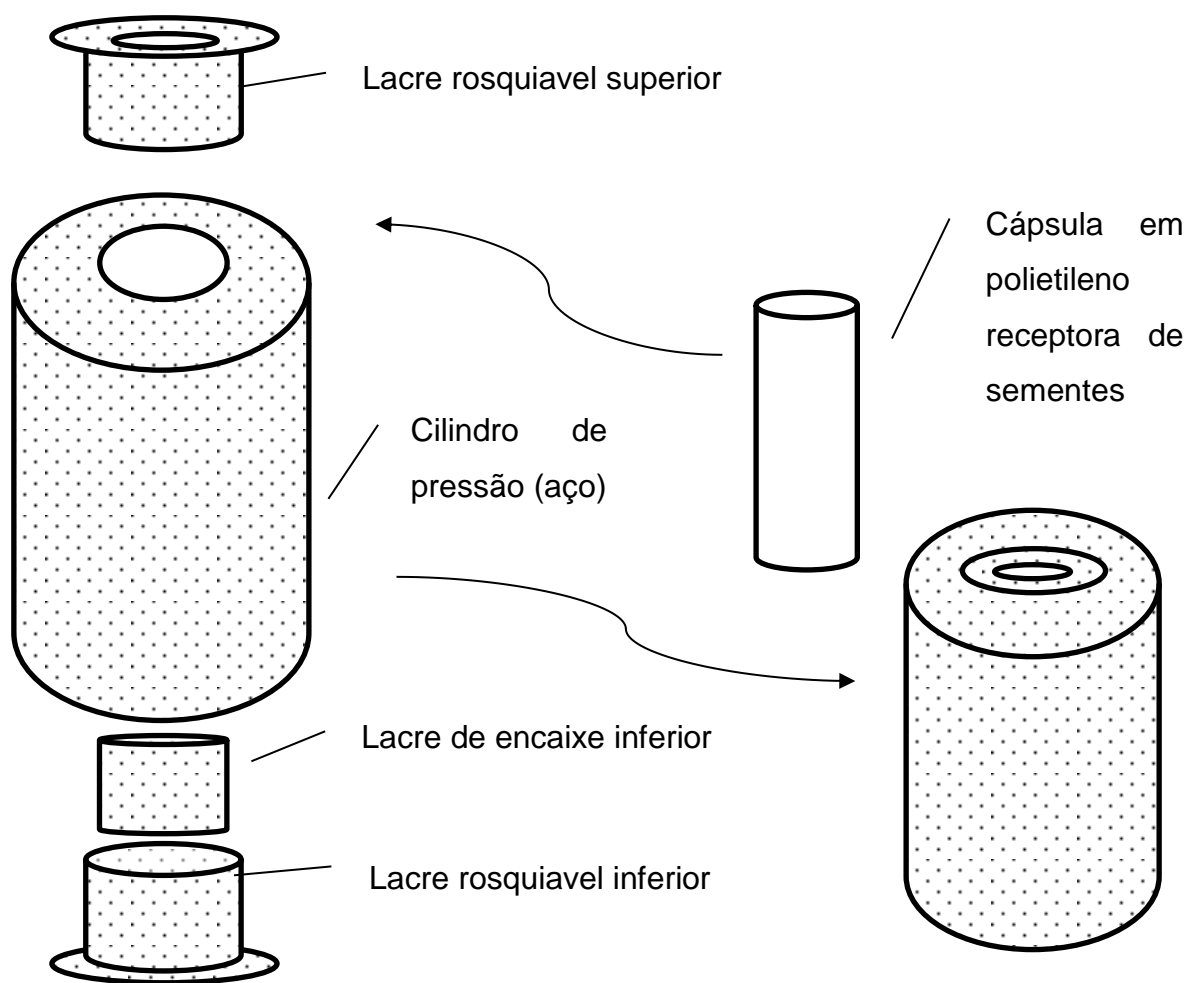


Figura 4 – Montagem do Cilindro de pressão contendo a cápsula de polietileno.

### **3.1.1 ASSEPSIA DE SEMENTES PÓS HHP**

A assepsia ocorreu somente para o experimento que tinha como objetivo a verificação de alterações dependentes do processo germinativo.

Verificou-se a necessidade de promover alterações nos protocolos de germinação de *Carica papaya* utilizado pelo laboratório de biotecnologia aplicado ao agronegócio, devido a não existência de protocolos de germinação para estresse abiótico por HHP.

A assepsia ocorre em capela de fluxo laminar, sempre após aplicação do estresse por HHP.

As sementes passaram por assepsia, em câmara de fluxo laminar, utilizando-se álcool 70 % durante 10 segundos e solução de hipoclorito de sódio a 2 % durante 10 minutos, em seguida, foram lavadas em água corrente por 30 minutos e água destilada por dois minutos.

### **3.1.2 GERMINAÇÃO PÓS HHP**

Após 30 minutos em cápsula de polietileno as sementes foram hidratadas por 120 minutos, e avaliadas para as variáveis: porcentagem de germinação, onde foram consideradas germinadas todas as sementes que apresentavam tegumento rompido com emissão da raiz com aproximadamente 2 mm de comprimento (figura 5) (BORGHETTI e FERREIRA, 2004).



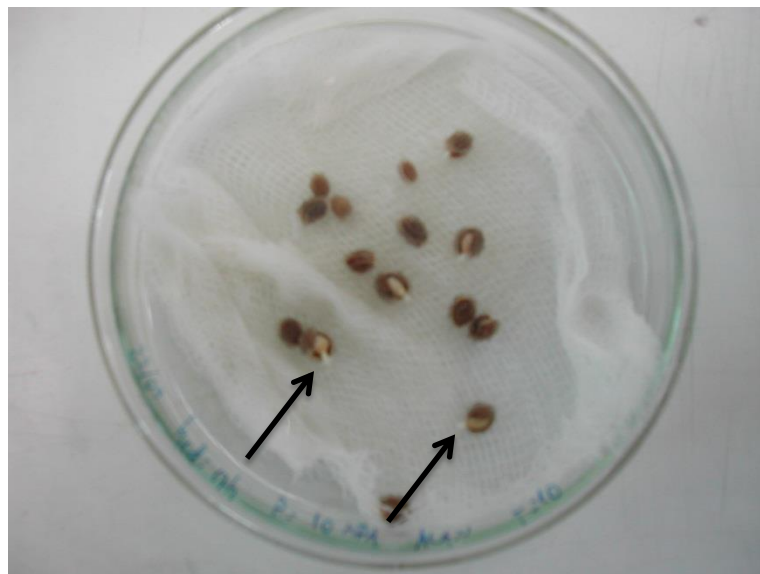


Figura 5. Semente de *Carica papaya* com emissão de 2 mm de raiz, indicado pelas setas, utilizada pelo experimento como fator caracterizador do processo germinativo inicial

Após o processo de assepsia, as sementes foram acondicionadas em placa de petri com 5 cm, contendo gaze e 3 ml de água destilada e autoclavada, sendo que o processo de germinação segue o protocolo modificado de germinação de *Carica papaya* do laboratório de Biotecnologia da UFES. (ANEXO 1)

Para o acompanhamento do processo germinativo as amostras foram submetidas ao estresse por HHP, para germinação *in vitro*, à temperatura de 25° a 30° C, mantidos em câmara de germinação (BOD), sobre gaze esterilizada em lâmpada de UV.

A câmara de germinação apresenta regulação de temperatura e luminosidade, com alternância de temperatura, variando entre 20 a 30 °C e fotoperíodo de 8 h de luz, durante 15 dias, com o objetivo de impedir alterações bruscas na temperatura e condições de luminosidade, aproximando-se das variações naturais de temperatura e iluminação naturais

Os experimentos foram avaliados diariamente, durante 15 dias quanto à percentagem de germinação (% G).

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, incluindo o controle e três repetições. Cada unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri, contendo cinquenta sementes.

O teste de germinação foi instalado com seis experimentos de três repetições e 50 sementes por tratamento, que foram dispostas em gaze, umedecidos com água destilada e autoclavada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do seca. Levados para um germinador regulado à temperatura alternada 20 - 30°C por 15 dias. A avaliação constou de 3 contagens, sendo a primeira a dois dias, a segunda a quatro dias, a terceira a sete dias e a última a quinze dias, de acordo com os critérios estabelecidos por (BRASIL, 1992).

O teste de germinação das sementes de *Carica papaya* foi realizado conforme descrito nas regras para análise de sementes (BRASIL 1992).

O teste de germinação foi conduzido em placa de petri, com duas folhas de gaze, sendo uma para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso seco (BRASIL 2009), colocados em germinadores. As avaliações foram realizadas, durante 15 dias, sendo registrados os embriões germinados os que apresentavam emissão de raiz até 2 mm.

As placas foram vedadas com parafilm, e o substrato permaneceu úmido no transcorrer dos testes.

Todos os testes foram conduzidos em câmaras de germinação do tipo BOD, com lâmpadas fluorescente do tipo “luz do dia” (4 x 20W). Em todas as temperaturas testadas, o fotoperíodo foi de 8 horas.

A contagem foi realizada diariamente até o momento da completa estabilização da germinação. Considerou-se como semente germinada as que apresentavam raiz primária menor ou igual a 2 mm de comprimento .

Com os valores encontrados, calculou-se a porcentagem de germinação.

As análises foram realizadas com auxílio do soft ASSISTAT (ANEXO 3)

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado (6 x 3), com quatro repetições de 50 sementes. Foram analisados os parâmetros germinação normal (%) e velocidade de germinação. Os melhores resultados foram obtidos na pressão de 50 MPa.

A germinação foi avaliada diariamente, com a contagem final realizada após 15 dias do início dos experimentos. Os resultados em porcentagem foram transformados em arco seno  $(\%/100)^{1/2}$  para normalização de sua distribuição. Foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias, e houve significância pelo teste F (Steel & Torrie, 1980).

### **3.1.3 GERMINAÇÃO IN VITRO**

As sementes foram germinadas in vitro, sendo que receberam como substrato de crescimento, gaze, que foi esterilizada em UV, sendo o teste de germinação realizado em 2012 em ambiente laboratorial.

Os testes de germinação das sementes de *Carica papaya*, submetidos ao estresse por HHP, foram conduzidos em câmaras de germinação do tipo BOD, com lâmpadas fluorescente do tipo “luz do dia” (4 x 20W), com fotoperíodo de 8 horas.

A contagem foi realizada diariamente até o momento da completa estabilização da germinação. Considerou-se como semente germinada as que apresentavam raiz primária menor ou igual a 2 mm de comprimento .

Com os valores encontrados, calculou-se a porcentagem de germinação.

### 3.2 PROTOCOLO DE HIDRATAÇÃO

O experimento seguiu o protocolo de estresse em sementes, consistindo de submeter cada lote de 50 sementes ao estresse por HHP, e analisar a variação do ganho de peso por hidratação e retenção hídrica. Os valores dos dados da variação peso, ocorreram em pesagem anterior e posterior ao estresse, e após secagem sobre papel toalha em ambiente de laboratório, a temperatura ambiente até que o peso de cada lote alcance o peso dos lotes secos, dessa forma analisou-se a capacidade que o estresse por HHP tem de proporcionar assimilação da embebição nas sementes de *Carica papaya*

As sementes foram pesadas antes de serem submetidas ao estresse por HHP e após o estresse por HHP.

A análise da elevação dos teores de água das amostras de sementes foi realizada empregando-se 3 repetições de 50 sementes, imediatamente após o estresse abiótico por HHP

Após aplicação dos experimentos por HHP, as sementes foram hidratadas por 120 minutos, pesadas em balança analítica com precisão de 0,00001 g, Para cada pesagem as sementes foram secas em papel filtro para retirar o excesso de água da superfície. As pesagens foram realizadas imediatamente após aplicação do HHP, sendo os resultados expressos em aumento de peso em relação ao peso da matéria fresca inicial.

As sementes tiveram suas massas frescas, determinadas diariamente, a fim de se obter os teores de água pré-estabelecidos.

Os dados das características avaliadas foram submetidos a análise descritiva, obtendo se as respectivas medias, valor mínimo, valor máximo, coeficiente de variação e erro padrão da media.

Para o bioensaio de experimento de hidratação foi avaliado o ganho de massa, com a finalidade de identificar uma possível interferência do estresse por HHP ao qual as

mesmas foram submetidas, investigando uma possível entrada de água na semente, ocasionado pela característica do HHP, como processo homogêneo de estresse e interferência sobre a solubilidade da membrana plasmática.

Foi construída um gráfico de hidratação (Figura 6) dos lotes de sementes segundo o estresse por HHP a qual cada lote foi submetido.

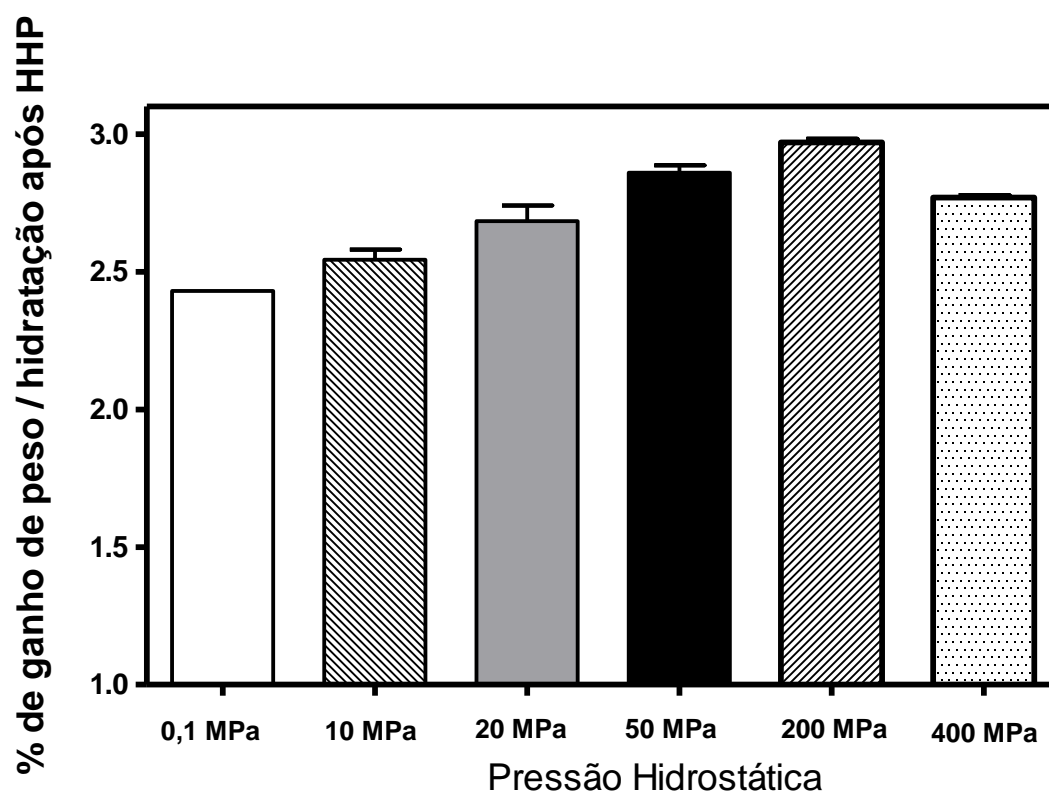


Figura 6. Ganho de peso das semente por hidratação, com e sem estresse por HHP.

Para cada comparação entre as médias, foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, quando houve significância (SANTANA e RANAL, 2004). Os lotes foram submetidos análise estatística utilizando soft ASSISTAT.

### **3.3 DETERMINAÇÃO DO ABA, PROTEÍNAS, PEPTÍDEOS E FENÓIS EM HPLC**

#### **3.3.1 PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE POR HPLC**

Utilizou-se 2 ml do fluido utilizado como meio de transferência da pressão, que foi a água presente na cápsula de pressurização, onde as sementes foram submetidas as diferentes tipos de pressão hidrostática.

Esse fluido foi retirado da cápsula de pressão, filtrada em gaze enterelizada, e armazenada em recipiente próprio para análise do HPLC, e mantido em refrigeração em temperatura entre 10 a 14° C.

Foi realizado 6 diferentes tipos de experimentos, relacionados ao estudo comparativo da aplicação do HHP com o grupo controle, sendo as pressões do experimento equivalentes aos valores de 10, 20, 50, 200 e 400 MPa, sendo o controle a pressão de 0,1 MPa, cada experimento foi repetido em triplicata.

A análise por HPLC foi realizada por meio da injeção de 20 µL da alíquota em uma coluna de fase reversa HRC – ODS C 18 4,6 x 25 cm (Shimadzu Co, Kyoto, Japão) conectada a um aparelho HPLC SLC 10A VP (Shimadzu) e a absorbância monitorada com detector UV visível (SPD m10A VP) em comprimento de onda de 190, 214, 220, e 280 nm.

A fase móvel foi constituída de água : acetonitrila (40:0-100), através de fluxo gradiente, pH 2,8, sendo a velocidade do fluxo foi 0,6 mL min<sup>-1</sup> e a pressão de operação 7,5 MPa.

A presença das moléculas, como fitormônios, peptídeos, proteínas e fenóis, foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC).

A confirmação de ABA foi feita por meio de comparação do tempo do pico de retenção do cromatograma de ABA comercial e fortificação das amostras com o padrão comercial, confirmadas pela presença do pico entre 190 e 220 nm.

As amostras a serem analisados para comparação das presenças de ABA, foram injectadas em coluna de fase reversa C18 da Waters, (3,9 x 150 mm, poro 60 Å, Ø da partícula de µm). A molécula citadas fixada à resina da fase estacionária da coluna, foi eluída num gradiente de 0-100 de acetonitrilo, com um fluxo de 0.6 ml/min.

A velocidade do fluxo foi 0,6 ml / min e a pressão de operação 7,5 MPa. A confirmação de ABA foi feita por meio de comparação do tempo do pico de retenção do cromatograma de ABA comercial e fortificação das amostras com o padrão comercial.

### **3.3.2 DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ABCÍSIKO, PROTEÍNAS, PEPTÍDEOS E FENOL**

Moléculas endógenos que estão relacionadas com o estresse abiótico, sofrem variações, em resposta ao próprio estresse, como exemplo dessas, cito o ácido abscísico (ABA), proteínas, aminoácidos e fenol.

Para a determinação das variações de ABA, proteínas, peptídeos e fenol, desenvolveu-se um protocolo, onde o extrato utilizado como material de análise foi o fluido de transferência de pressão, que nesse experimento foi a água presente na cápsula de pressurização, ao qual foi separada após tratamento por HHP, armazenada em temperatura de refrigeração, e levada para análise em HPLC.

O ABA foi determinado por um protocolo, que utiliza a água presente na cápsula de pressurização, após estresse por HHP, nas pressões de 10, 20, 50, 200 e 400 MPa, em comparação com o grupo controle, que apresenta pressão ambiente de 0.1 MPa.

A água pressurizada foi retirada da cápsula de polietileno, armazenada em temperatura de refrigeração, entre 10 e 14° C e sua análise seguiu o protocolo para verificação da presença de ácido abscísico em HPLC (ORTIZ, 2008).

O método utilizado para verificação da presença e possível alteração das concentrações de ácido abscísico se fez por análise da água presente como meio de transporte da pressão, retiradas da cápsula de polietileno, a confirmação da presença do ABA se fez por nova análise das mesmas amostras dessa água, fortificadas com 0.1 mg de ABA industrial.

Para determinação das demais moléculas citadas, o protocolo de extração, armazenamento e análise, seguiu o protocolo usada para análise do ácido abscísico, com algumas alterações, pois, a literatura possui protocolos de verificação de presença de proteínas, aminoácidos e fenol, que indicam a necessidade da presença de duplo pico em 214 e 280 nm (DE ASSUMPÇÃO, 2007), e para detecção da presença de proteínas e peptídeos, o duplo pico ocorrerá em 280 e 325 nm (AGUILAR, 2004).

As amostras a serem analisados para comparação das presenças de proteínas e fenol, foram injectadas em coluna de fase reversa C18 da Waters, (3,9 x 150 mm, poro 60 Å, Ø da partícula de µm). As moléculas citadas que foram fixadas à resina da fase estacionária da coluna, foram eluídas num gradiente de 0-100 de acetonitrilo, com um fluxo de 0.6 ml/min.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DO HHP SOBRE HIDRATAÇÃO E GERMINAÇÃO

Com referência à porcentagem de germinação (%) (Tabela 1), os resultados verificados em sementes de *Carica papaya*, revelaram diferenças entre os experimentos (ANEXO 3).

Tabela 1 – Porcentagem de germinação in vitro total, verificado nas sementes submetidas ao estresse por HHP.

HHP (MPa)	% de germinação
<b>0.1</b>	63
<b>10</b>	63
<b>20</b>	74
<b>50</b>	85
<b>200</b>	-
<b>400</b>	-

As diferenças entre os tratamentos (ANEXO 3), também ocorreu entre o tempo inicial de germinação, quando submetidas ao estresse por HHP (Tabela 2).

Tabela 2 – Início e fim do processo germinativo em sementes de *Carica papaya* submetidas ao estresse por HHP durante 30 minutos.

HHP (MPa)	Início (dias)	Término (dias)
0.1	7	15
10	4	15
20	4	15
50	2	15
200	-	-
400	-	-

Observa-se na Tabela 2, verifica-se que houve efeito benéfico dos tratamentos em relação ao controle apenas quando se avaliou a germinação para valores de pressão hidrostática, superiores a 10 MPa na velocidade de germinação. Os menores valores de germinação foram obtidos para as sementes com 10 MPa tanto aos 7 dias (23%) como aos 15 dias (67%).

As porcentagens de germinação que não apresentaram diferenças significantes ao grupo controle (ANEXO 3), constatadas em sementes submetidas a 10 MPa, fato que indica esse experimento, como a menos adequada, comparativo as demais experimentos e resultados (Tabela 1)

As seleção prévia de sementes de melhor desempenho, foi fundamental para verificação das alterações ao qual o HHP pode ocasionar.

Verificou-se que, a germinação teve início entre o segundo e o sétimo dia após a semeadura, em função dos tratamentos de diferentes pressões. A máxima germinação foi obtida entre o sétimo e o 15º dia, independente da pressão testada (Tabela 2).

Pode-se assim inferir sobre o segundo, sétimo e décimo quinto dia como dias de contagem para a avaliação da qualidade germinativa de sementes de *Carica papaya*. O experimento verificou também rápida velocidade de emergência.

As pressões testadas influenciaram a germinação de sementes de *Carica papaya*, onde os mais altos valores de porcentagem de germinação, e de velocidade de germinação foram encontrados na pressão de 50 MPa, tanto a capacidade de retenção hídrica de cada lote de semente, como as características intrínsecas que regulam o fluxo de água para as sementes.

Das pressões utilizadas, o valor ambiental 0,1MPa foi o que mostrou menor capacidade de retenção de água (Tabela 2), resultando nas menores médias de porcentagem e velocidade de germinação, quando comparamos as pressões que promoveram resposta germinativa, pois dois valores de pressão hidrostática ao qual as sementes foram submetidas (200 e 400 MPa), não ocorreu germinação.

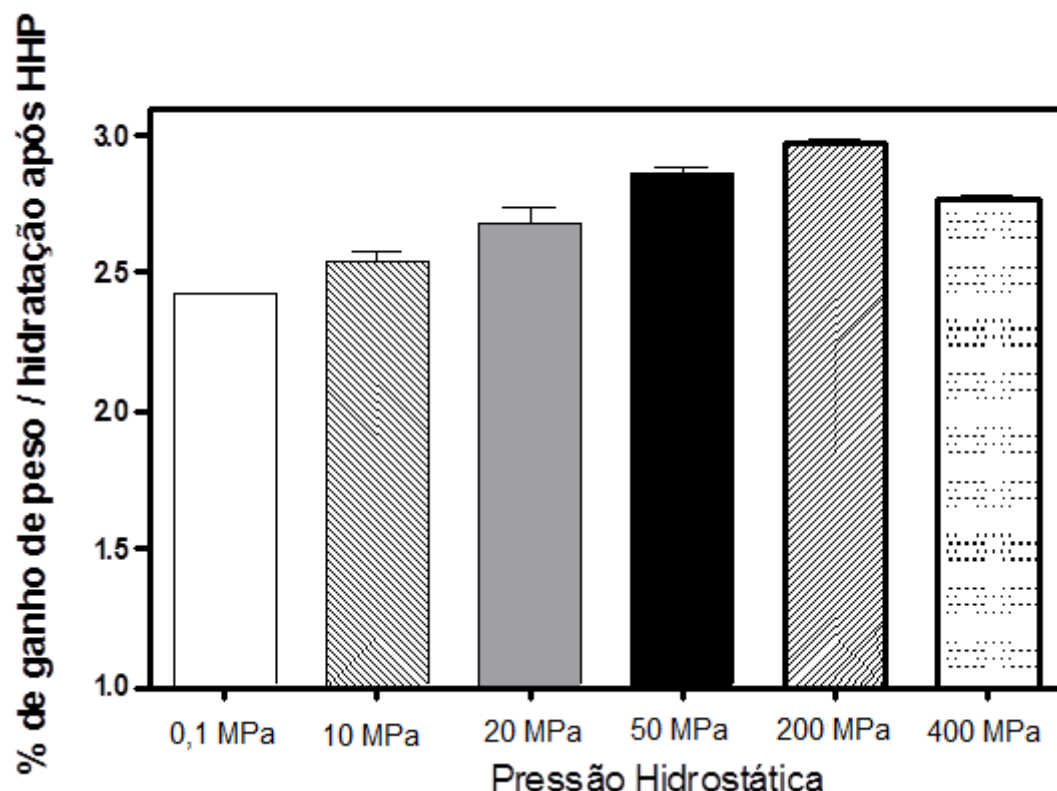


Figura 7. (%) de ganho de peso de sementes de *Carica papaya* após tratamento de pressão hidrostática, em comparação com o grupo controle de 0.1 MPa.

As sementes ganharam peso após serem submetidas aos tratamentos de alta pressão hidrostática (figura 7), quando comparadas ao grupo controle (0,1 MPa).

Os valores de ganho de peso por hidratação para as sementes submetidas a HHP foram superiores aos verificados para as sementes hidratadas a pressão ambiente de 0,1 MPa, indicando que a HHP contribui para aumentar a hidratação das sementes de mamão (figura 7).

O valor de HHP que apresentou maior percentual de germinação para sementes de *Carica papaya* foi o de 50 MPa, que promoveu os mais altos valores de porcentagem de germinação (Tabela 1) e velocidade médias de germinação.

A não ocorrência da germinação nas pressões de 200 MPa e 400 MPa (Tabela 1), pode ser resultado da alteração sobre a permeabilidade da membrana plasmática, pois quando submetemos proteínas a HHP, ocorre mudança conformacional e

consequentemente alteração da permeabilidade, o que leva a mudança na concentração de moléculas extra e intracelulares (MARCOS FILHO, 2005).

Neste trabalho, os resultados demonstram que as sementes de *Carica papaya* tiveram sua dormência modificada quando submetidas ao estresse por alta pressão hidrostática, influenciando o início do processo germinativo (Tabela 2), uma vez que ocorreu alteração da porcentagem de germinação e velocidade de emergência.

A hidratação das sementes, a pressão ambiente (0,1 MPa) são inferiores aos valores encontrados, pós estresse por HHP (figura 8) .

As sementes submetidas ao estresse, apresentaram um efeito na germinação (Tabela 1) e na velocidade de germinação (Tabela 2) à medida que a hidratação aumenta (figura 6), até a pressão de 50 MPa , pois os valores analisados de 200 e 400 MPa não ocorreu germinação, portanto, não existe correspondência de hidratação e germinação.

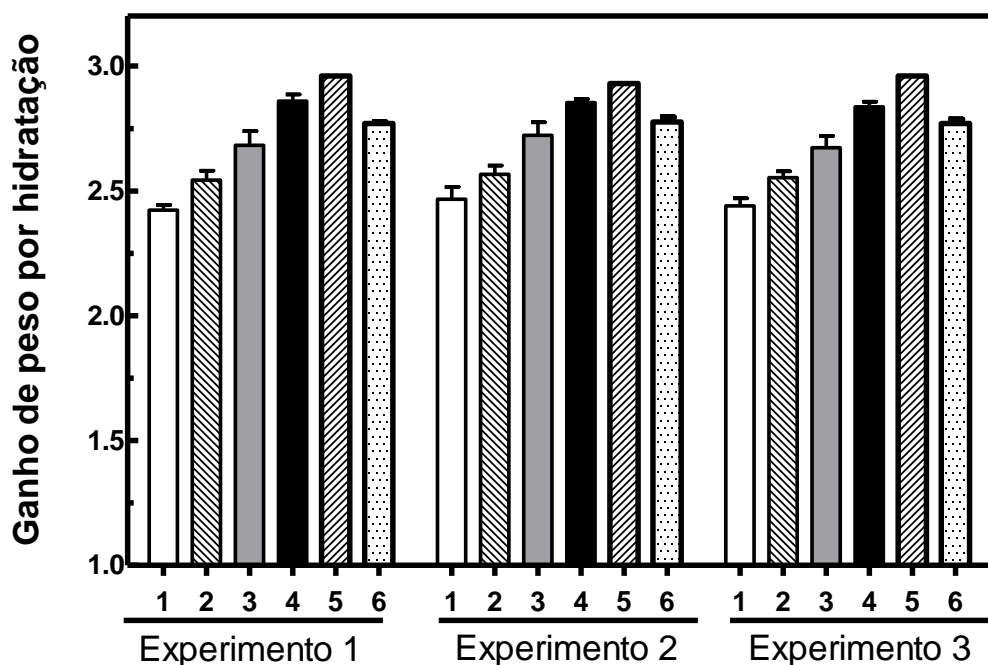


Figura 8. Ganho de peso por hidratação após estresse por HHP, utilizando pressões de 10 (2), 20 (3), 50 (4), 200 (5) e 400 MPa (6), quando comparada com o grupo controle de 0.1 MPa (1).

Os valores de germinabilidade diferiram estatisticamente (ANEXO 3) do controle, indicando sensibilidade das sementes ao estresse. A menor germinação foi observada em 10 MPa (60 – 65%), e ausência de germinação em 200 e 400 MPa (Figura 9).

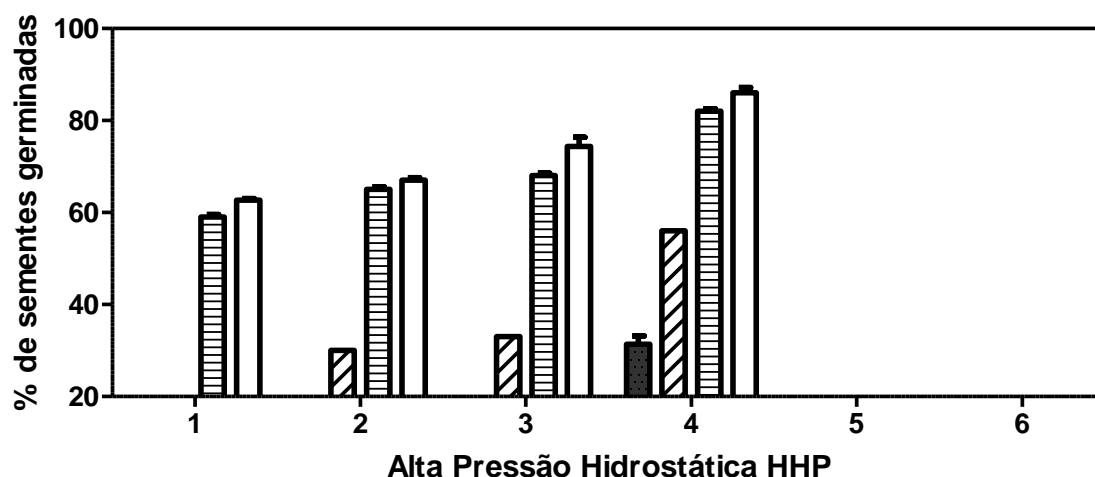


Figura 9. A resposta germinativas dos lotes de sementes de *Carica papaya* após estresse por HHP. A Coluna cheia indica germinação com 2 dias, a coluna com traços diagonais indica germinação com 4 dias, a coluna com traços horizontais indica germinação com 7 dias e a coluna lisa indica germinação com 15 dias.

A influência de fatores do ambiente de produção sobre o desenvolvimento da semente pode ser traduzida, dentre outros, por variações no seu tamanho e na sua massa. Portanto, fatores como a disponibilidade de água, ser considerados (MARCOS FILHO, 2005). O efeito da HHP para sobre cada experimento de sementes de *Carica papaya*, ocorre aumento da massa, corresponde ao maior % de hidratação (figura 9).

As sementes submetidas ao estresse por HHP, apresentaram respostas germinativa no 2º, 4º, 7º e 15º dia (figura 9), e o percentual apresentou-se superior ao grupo controle 0,1 MPa.

Observa-se, ainda que as sementes submetidas as pressões de 10, 20, 50 MPa apresentaram relação positiva entre hidratação e germinação (figura 9), enquanto que as sementes submetidas as pressões de 200 e 400 MPa não apresentaram resposta positiva entre hidratação e germinação (Tabela 2)

A germinação foi superior para as sementes submetidas aos tratamentos por HHP. Estes tratamentos foram superiores ao grupo controle. Verifica-se, portanto, que os tratamentos interferem positivamente na superação de dormência das sementes de mamão (*Carica papaya*) (figura 9).

A existência de diferença na velocidade de absorção de água por sementes de mamão a diferentes pressões hidrostáticas (Tabela 1), indicando o efeito da hidratação sobre o equilíbrio entre as concentrações de ABA e Giberilinas.

A hidratação das sementes submetidas a 200 MPa é superior as sementes submetidas a 50 MPa, porém, não ocorre germinação, o que também é acompanhado de ausência de germinação para as sementes submetidas a 400 MPa, embora seus valores de hidratação sejam inferior a 50 MPa (figura 6).

A causa para ausência de germinação em ambos possui causa distinta, seguindo que a semente de *Carica papaya* é sensível ao excesso de água (figura 7).

Infere-se que as correlações entre os dados podem auxiliar quanto às justificativas dos resultados de dano por embebição na presente de 200 MPa, considerando que a hidratação em sementes de mamão influencia a germinação.

O estresse por HHP a 400 MPa é capaz de danificar fisiologicamente o tegumento de proteção da semente de mamão, ocasionando excesso de hidratação (POPINIGIS, 1985).

Desta maneira, é esperada a absorção mais rápida de água por sementes que apresentam rachaduras e trincas, o que pode ser prejudicial devido a redução da integridade das membranas celulares, e decorrente perda de nutrientes essenciais.

Dentre outros fatores, a velocidade com que a água é absorvida pela semente depende da permeabilidade e integridade do tegumento (POPINIGIS, 1985).

Portanto, infere-se a possibilidade, na presente pesquisa, de existir relação entre a integridade do tegumento de revestimento e a velocidade de absorção de água pelas sementes.

As variações de velocidade de hidratação observadas para cada tratamento (figura 9), considerando a elevação percentual em água em cada período, permitem inferir que a metodologia da hidratação de sementes a 200 e a 400 MPa proporcionou às sementes ausência de germinação, similarmente ao constatado por (RODRIGUES et al., 2006).

ROSSETO et al. (1997) empregaram o mesmo método e também observaram necessidade de um período prolongado de absorção de água para atingir os graus de hidratação pretendidos.

Também (ROSSETO et al., 1997) observou diminuição da velocidade de absorção de água e dos danos por embebição com o aumento do teor de água das sementes.

A ocorrência acentuada de danos por embebição em sementes foi somente constatada em vista os incrementos crescentes na germinação com a elevação do teor de água (ROSSETO et al., 1997), além dos valores percentuais terem diferido estatisticamente dos de sementes com hidratação menor

## **4.2 HIDRATAÇÃO E GERMINAÇÃO**

A influência de fatores do ambiente de produção sobre o desenvolvimento da semente pode ser traduzida, dentre outros, por variações no seu tamanho e na sua massa. Portanto, fatores como fertilidade do solo, disponibilidade de água, temperatura e luz em determinada região devem ser considerados (MARCOS FILHO, 2005). Assim, quando considerado o efeito da HHP para cada lote de 50 sementes a maior massa, corresponde ao maior % de hidratação.

Foi verificado que as sementes de diferentes cultivares apresentaram comportamentos distintos. As variações observadas quanto aos dados qualitativos



das sementes, conforme os testes empregados, reitera a dificuldade assinalada por CAVARIANI (1996) para a escolha dos mesmos. Assim, foi considerado o número de superioridades estatísticas (testes) de variedades, para possibilitar possíveis relações de características fisiológicas com a ocorrência de dano por embebição.

Desta maneira, é esperada a absorção mais rápida de água por sementes que apresentam rachaduras e trincas, o que pode ser prejudicial devido à redução da integridade das membranas celulares, e decorrente perda de nutrientes essenciais.

Dentre outros fatores, a velocidade com que a água é absorvida pela semente depende da permeabilidade e integridade do tegumento (POPINIGIS, 1985).

Portanto, infere-se a possibilidade, na presente pesquisa, de existir relação entre a integridade do tegumento de revestimento e a velocidade de absorção de água pelas sementes.

Conforme a Tabela 2, referente às elevações percentuais do teor de água em cada momento, a velocidade de absorção de água mostrou diferenças entre os tratamentos.

As variações de velocidade de hidratação observadas para cada tratamento, considerando a elevação percentual em água em cada período (Tabela 2), permitem inferir que a metodologia proporcionou às sementes maior absorção, similarmente ao constatado por RODRIGUES et al. (2006).

Também ROSSETO (1995) observou que existe danos por embebição com o aumento do teor de água das sementes, o que pode ser uma das respostas pelo efeito negativo da germinação ocorrido em 200 e 400 MPa, embora apresentaram absorção de água acima da pressão ambiente (Tabela 2)

A avaliação da velocidade de hidratação considerou metodologia descrita por DEL GIÚDICE (1996) e VIEIRA et al. (1982), com modificação no número de sementes em cada amostra, de 100 para 50 sementes, como proposto por COSTA et al. (2002).

A velocidade de hidratação constou de uma possibilidade de ocorrência de danos por embebição durante o processo de elevação do teor de água.

A ocorrência acentuada de danos por embebição em sementes foi somente constatada em vista os incrementos crescentes na germinação com a elevação do teor de água, além dos valores percentuais terem diferido estatisticamente dos de sementes com hidratação menor.

Os lotes de semente foram submetidos as pressões de 200 e 400 MPa, que ocasionaram maior potencial de hidratação, porém, não houve germinação das sementes submetidas a esses valores de estresse por HHP (Tabela 2).

Quanto à evolução do processo de absorção de água, foi observada, diferenciação entre os tratamentos quanto ao ganho percentual cumulativo no teor de água em cada tratamento por HHP (figura 6). Foram constatados, aumento da capacidade absorptiva das sementes, a medida que as mesmas são submetidas ao aumento da pressão por HHP (figura 7).

Como pode ser observado pelos dados associados à hidratação e, a capacidade germinativa das mesmas destacou-se uma influência da hidratação com a quebra de dormência das sementes de *Carica papaya* (Tabela 2), até o valor de 50 MPa, pois acima desse, não é observada correlação positiva entre hidratação e germinação, pois, embora as sementes mantenham-se com maior capacidade absorptiva, esses valores não encontram correspondência sobre a quebra de dormência.

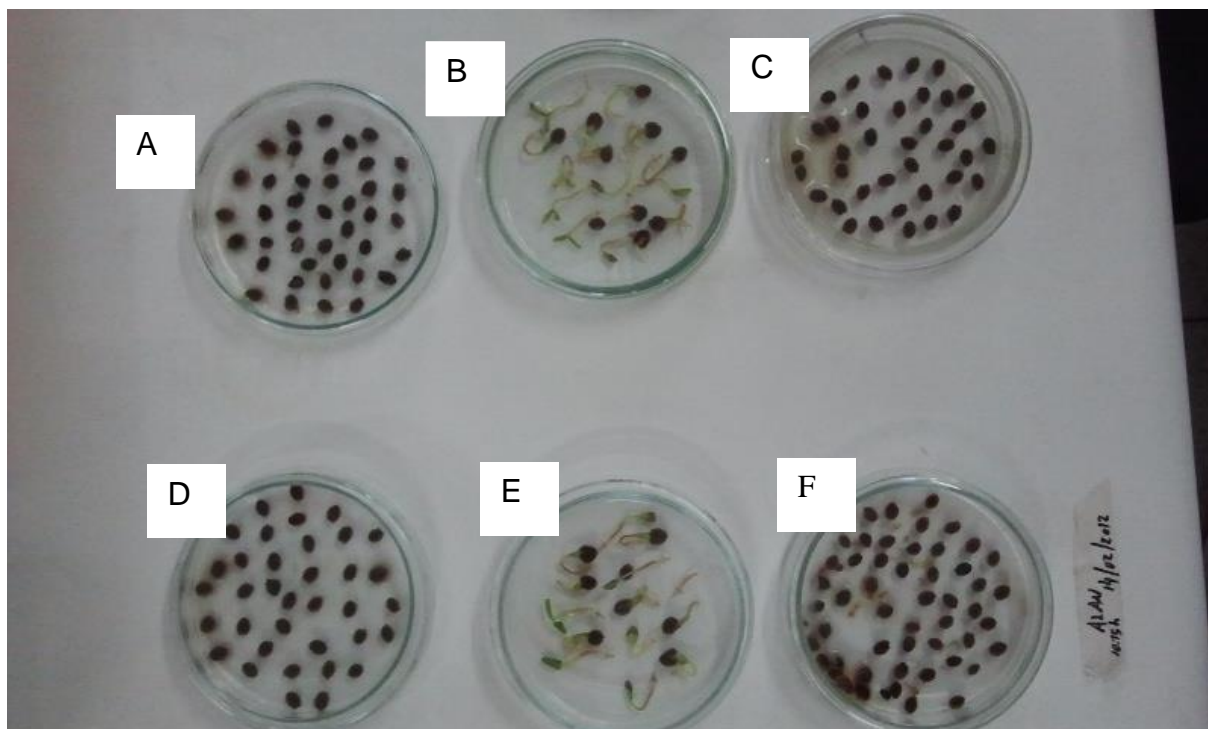


Figura 10. Sementes germinadas submetidas ao estresse por HHP a 50 MPa (A, B, E e F) e sementes submetidas a 400 MPa

Comparação entre sementes de *Carica papaya* submetidas a HHP de 50 MPa, germinadas aos 2 (figura 10, B e figura 10, E) e 15 dias (figura 10, A e figura 10, F), B e E germinaram no 2º dia, enquanto as sementes A e F germinaram aos 15 dias, enquanto que as sementes submetidas a 400 MPa, indicadas em D e C não germinaram (figura 10).

Os tratamentos que não se mostraram eficientes neste ensaio foram excluídos dos ensaios seguintes, sendo substituídos por outros tratamentos para a superação da dormência de sementes.

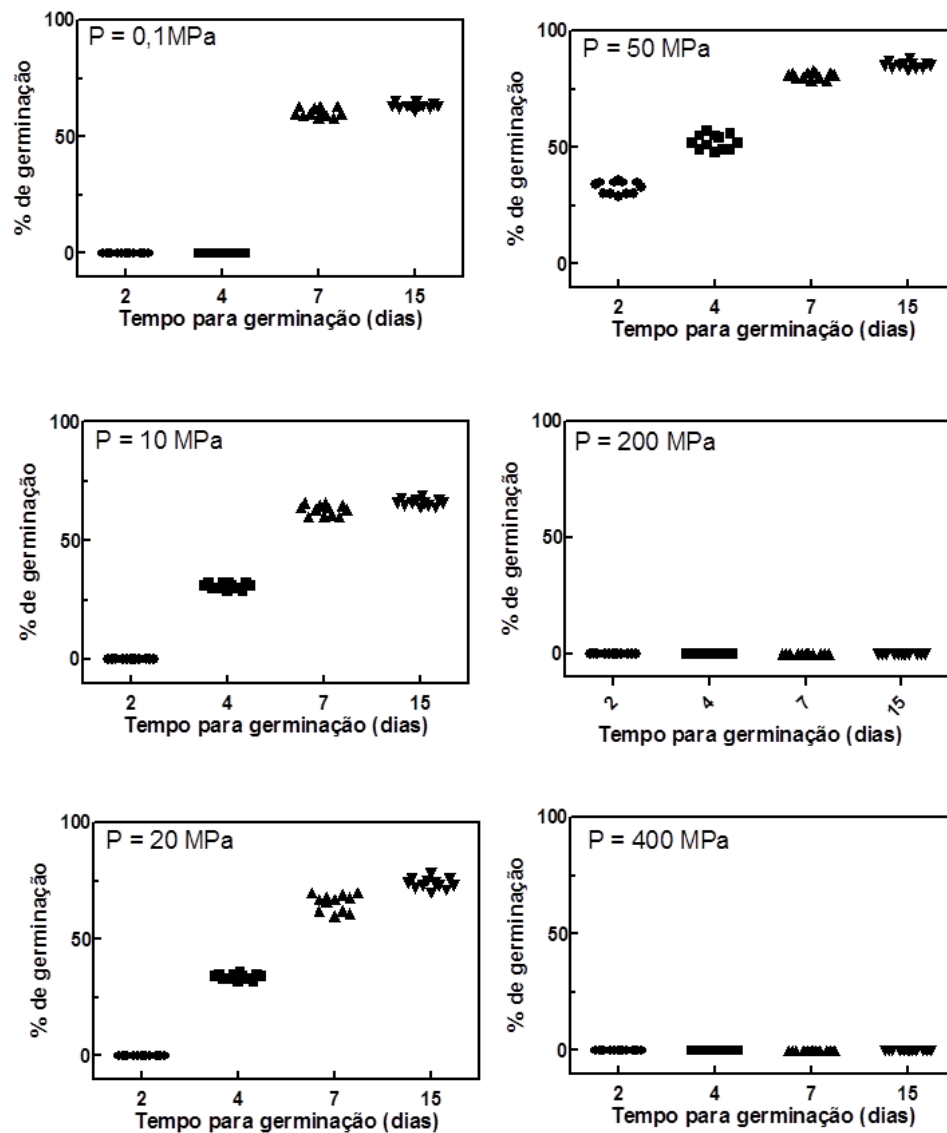


Figura 11. A análise estatística das germinações de sementes submetidas a HHP e grupo controle (0,1 MPa).

0000

As sementes de *Carica papaya*, submetidas ao estresse, apresentaram um efeito positivo na germinabilidade e na velocidade de germinação (figura 11). Tendo a análise estatística (ANEXO 3), encontrado valores significativos.

Tabela 3 – Percentual de germinação das sementes submetidas ao estresse por HHP e do grupo controle (0,1 MPa).

	0,1 MPa	10 MPa	20 MPa	50 MPa	200 MPa	400 MPa
02 dias	00 %	00 %	00 %	35 %	00 %	00 %
04 dias	00 %	30 %	35 %	55 %	00 %	00 %
07 dias	60 %	65 %	70 %	80 %	00 %	00 %
15 dias	65 %	65 %	75 %	85 %	00 %	00 %

Os fatores germinação, hidratação e velocidade de germinação, foram analisados de acordo com métodos nacionais de avaliação de mecanismos fisiológicos inerentes ao estudo de sementes; já a presença de proteínas, aminoácidos, fenol e ácido abscísico (ABA), foram analisados via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados foram analisados por soft de bioestatística ASSISTAT, apresentando diferenças significativas, estatisticamente relevantes (ANEXO 3).

As sementes de *Carica papaya*, submetidas ao estresse, apresentaram um efeito positivo na germinabilidade e na velocidade de germinação. Os valores diferiram estatisticamente do controle (65%) a 0,1 MPa, enquanto que a pressão de 10 MPa não diferiu estatisticamente do grupo controle (65 %), as pressões de 20 e 50 MPa apresentaram significância, atingindo 75 e 85 % respectivamente. Foi observado que pressões de 200 e 400 MPa, interferem negativamente na germinação, pois os lotes de sementes submetidos a esse grau de estresse por HHP não apresentaram germinação (Tabela 3)

A avaliação da germinação possibilitou a confecção dos gráficos de germinação (Figura 11). Verificou-se que a germinação teve início no segundo (50 MPa), no quarto (10 e 20 MPa) e sétimo dia (0,1 MPa), após a semeadura. A máxima germinação foi obtida no sétimo (10 MPa) e o 15º dia (0,1; 20 e 50 MPa).

Os fatores germinação, hidratação e velocidade de germinação, teor de proteínas, aminoácidos, fenol e ácido abscísico (ABA), cuja análise foi realizada via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foram estatisticamente diferentes,

principalmente para o valor de 50 MPa, onde os valores encontrados foram positivos para a germinação.

Para a variável porcentagem de germinação pode-se observar que sementes com valores de estresse em torno de 50 MPa proporcionaram melhores porcentagens de germinação (tabela 3), com 85% de sementes germinadas), diferindo significativamente das pressões 0,1 Mpa (65 %), 10 MPa (65%) e 20 MPa (75%), enquanto que as sementes submetidas as pressões de 200 e 400 MPa não obtiveram resposta germinativa (tabela 3).

Foi verificado aumento de contaminação por fungos em sementes submetidas a 10 MPa, em comparação com os demais tratamentos, conforme observado por PALHANO et al (2004). A contaminação por fungos interfere com a capacidade germinativa das sementes.

Porcentagens inferiores normais foram constatadas em sementes submetidas a 10 MPa, fato que confirma as referências a esse experimento, como a menos adequada, em comparação com os demais tratamentos por HHP.

A resposta da hidratação sobre a ausência de germinação, ocorrida após submeter as sementes a valores de 200 e de 400 MPa, pode ser a resposta para tal fato (COSTA et al 2002).

Os dados obtidos no teste de germinação para as sementes em estudo foram submetidos à análise de variância (ANEXO 3), e constatou-se que para a porcentagem de ganho de peso, tempo de retenção hídrica, tempo de germinação e porcentagem de germinação foi significativo da interação superação de dormência e estresse por HHP (figura 11) .

De acordo com BEWLEY & BLACK (1994) o estresse hídrico pode reduzir tanto a porcentagem quanto a velocidade de germinação, com uma grande variação de respostas entre as espécies, desde aquelas muito sensíveis até as mais resistentes.

Outra variável favorável ao processo hidratação é a sua influência sobre a quebra de dormência e estímulo sobre a germinação (POULSEN ET AL 1998)

### **4.3 ANÁLISE DO FLUIDO DE TRANSFERÊNCIA DE PRESSÃO POR HPLC**

#### **4.3.1 ANÁLISE DE ABA**

O fluido para transferência de pressão, utilizado em HPLC mostrou-se útil para uso em análises que necessitam de amostras com determinado grau de pureza.

A determinação do ácido abscísico foi ocorreu por análise de presença desse fitormonio na água que serviu como meio de transmissão da pressão, aplicada sobre as sementes, o líquido utilizado para tal finalidade interage com as moléculas do material a ser submetido ao tratamento por HHP, ocorrendo então troca de fluidos entre o meio intra e extra celular.

A presença de ABA no flúido de transferência de pressão, caracterizou-se pela presença do pico visualizado em cromatógrafo, com tempo de retenção de 3,5 minutos, por UV visível, em amostras controle (0,1 MPa), fortificadas com ABA industrial (figura 13 B e 13 C), as amostras controle sem a fortificação de ABA industrial não apresentaram pico em cromatógrafo de forma relevante para caracterização de moléculas em HPLC (figura 12).

O equilíbrio entre as concentrações de ácido abscísico e giberelinas está diretamente relacionado a germinação. O ABA inibia a alfa amilase, enquanto que a giberelina a induz.

Quando o condicionamento das sementes é favorável, ocorre o processo de mobilização de reservas, ativação e síntese de algumas enzimas, e início e aumento da síntese de DNA e RNA, disponibilizando as sementes os precursores utilizados na síntese de macromoléculas. Essas sínteses podem estar relacionadas à remoção de certos agentes inibidores da germinação, como o ácido abscísico (ABA), ou à produção de fatores promotores, como o ácido giberélico (Jeller e Perez, 2003).

Além do aspecto exposto anteriormente, o ácido abscísico atua, também, no processo de embebição, regulando o teor de umidade disponível para o embrião. Assim, foi observado por Schopfer *et al.* (1979), em sementes de *Sinapis alba*, que o ácido abscísico inibia, reversivelmente, a germinação pela inibição na absorção de umidade.

As amostras do fluido de transferência de pressão submetidas a HHP, de 10, 20, 50, 200 e 400 MPa, apresentaram picos em cromatógrafo com tempo de retenção de 3,5 min (figuras 14, 15, 16, 17 e 18).

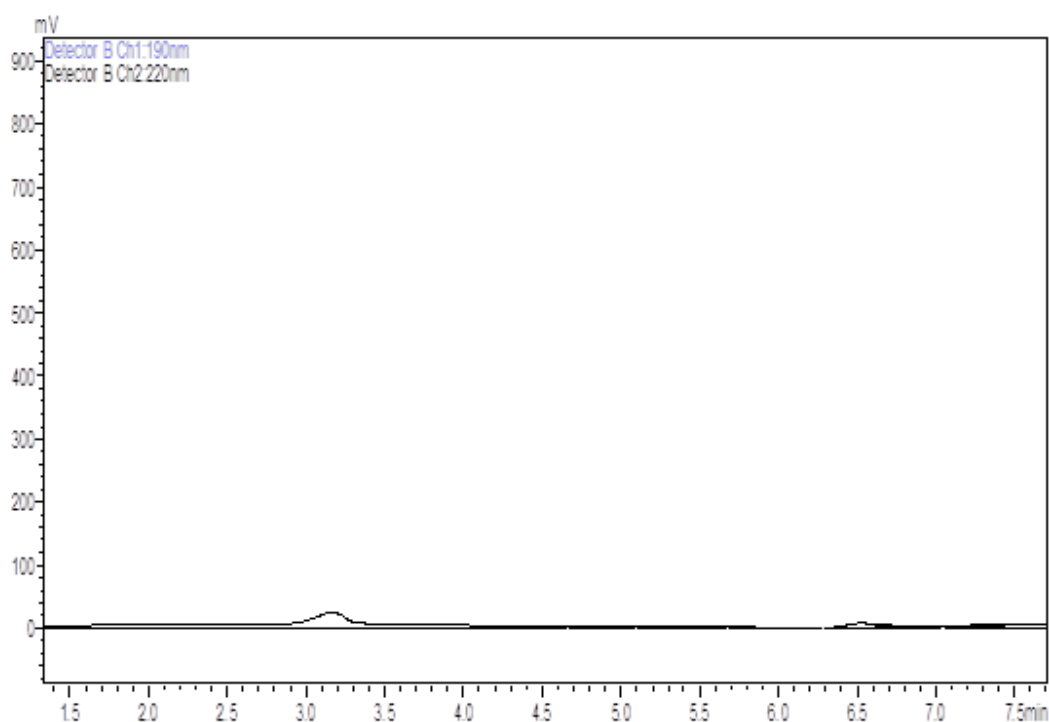


Figura 12. Perfil cromatográfico em HPLC, da água presente na cápsula de pressão, no experimento controle a 0.1 MPa, que corresponde a pressão ambiente, com detector UV regulado para 190 e 220 nm.

A confirmação da presença se fez pela análise dos picos e fortificação da amostra controle com um ABA comercial.



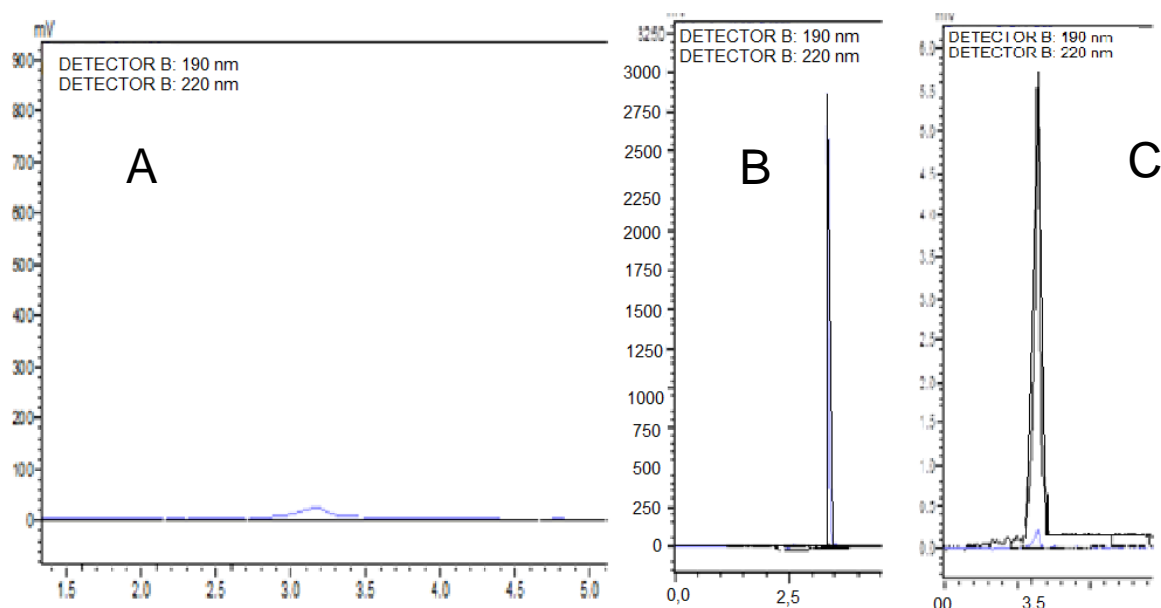


Figura 13. Perfil cromatográfico do extrato presente nas cápsulas pressurizadas representa o extrato retirado de sementes do grupo controle (A) e do grupo controle fortificado (B e C), hidratada por 120 minutos.

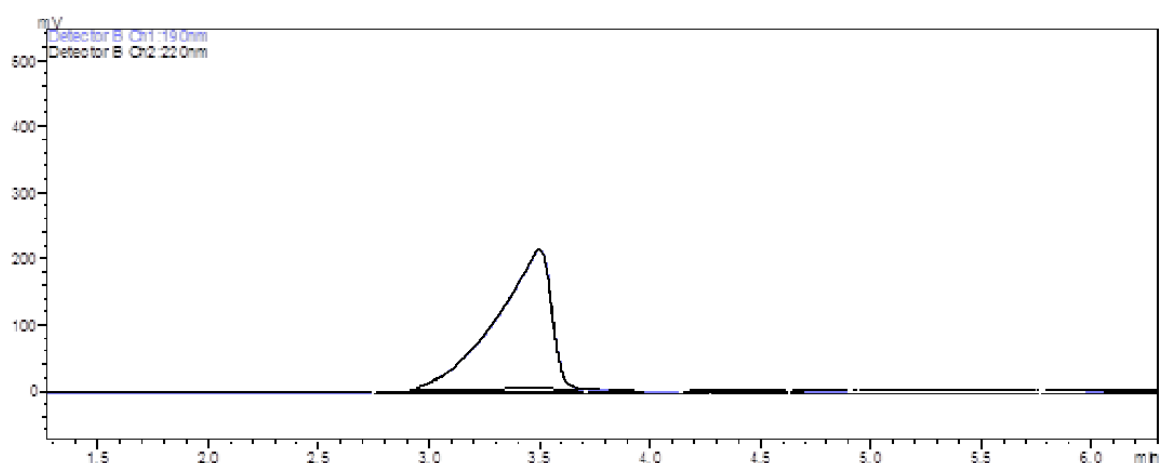


Figura 14. Perfil cromatográfico do extrato presente nas cápsulas pressurizadas, submetidas a pressão de 50 MPa.

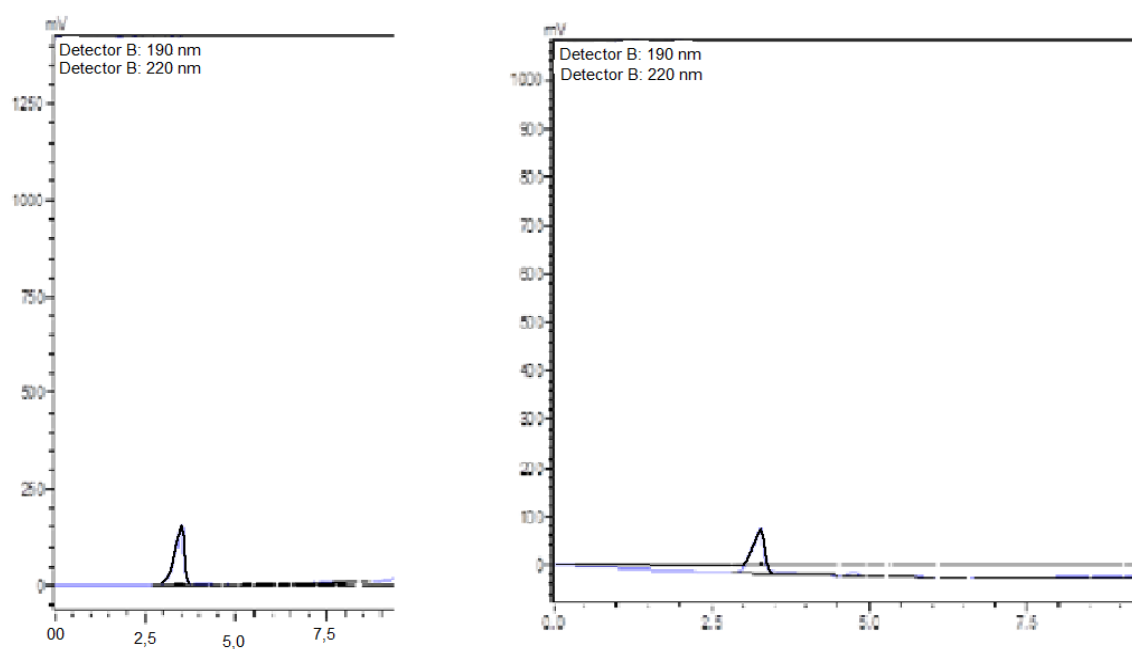


Figura 15. Perfil cromatográfico do extrato presente nas cápsulas pressurizadas, submetidas a 50 MPa.

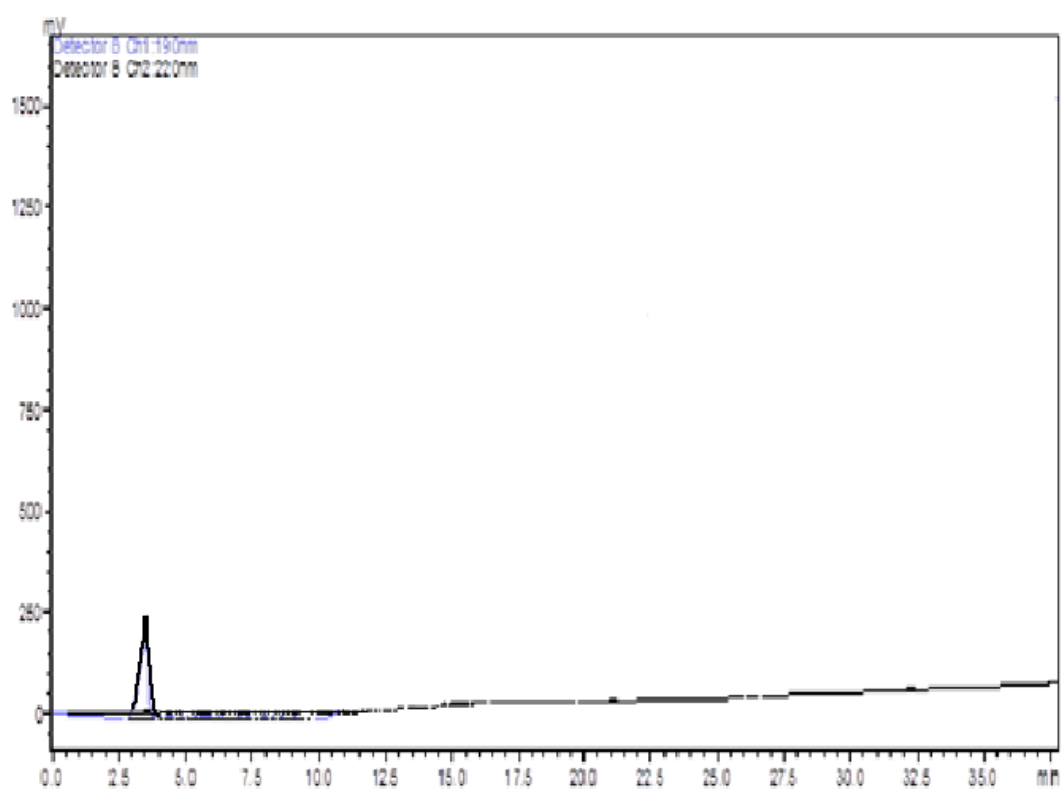


Figura 16. Perfil cromatográfico do extrato presente nas cápsulas pressurizadas, de sementes pressurizadas a 200 MPa.

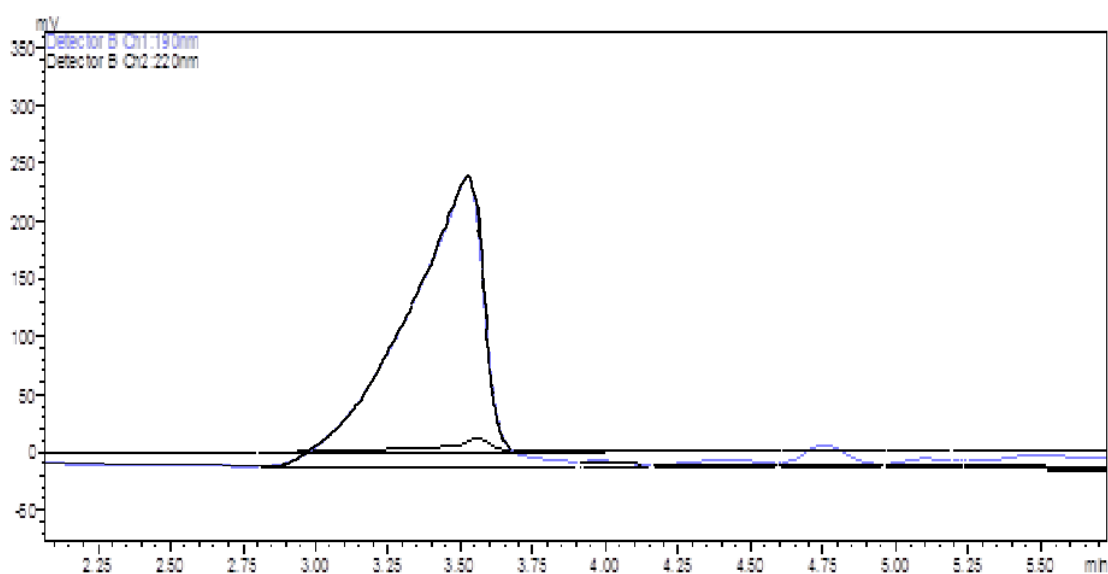


Figura 17. Imagem ampliada do pico representado na figura 16, confirmando a presença do pico do extrato proveniente da água de pressurização com um tempo de retenção de 3,5 minutos .

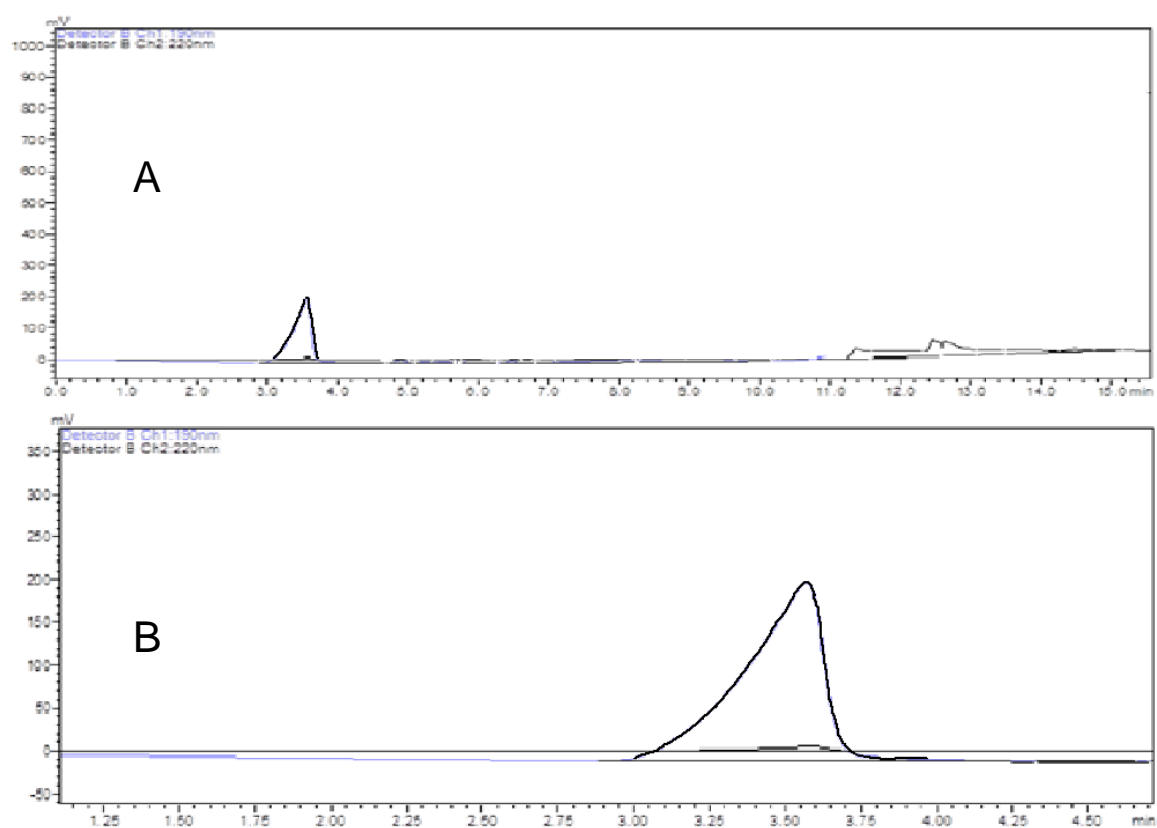


Figura 18. Perfil cromatográfico da água pressurizada de sementes submetidas a pressão hidrostática de 400 MPa.

#### **4.3.2 ANÁLISE DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS**

A determinação de proteínas e peptídeos seguiu protocolo que indica a presença de moléculas protéicas ao ajustar a detecção em UV no HPLC em 214 e 280 nm, sendo a confirmação, a presença de um pico em conjunto, tanto em 214, quanto em 280.

A ação do ABA. Mayer & Poljakoff-Mayber (1975) relatam que a ação do ácido abscísico na indução à dormência pode ser atribuída ao efeito que este exerce no

metabolismo do ácido nucléico, impedindo formação de enzimas.

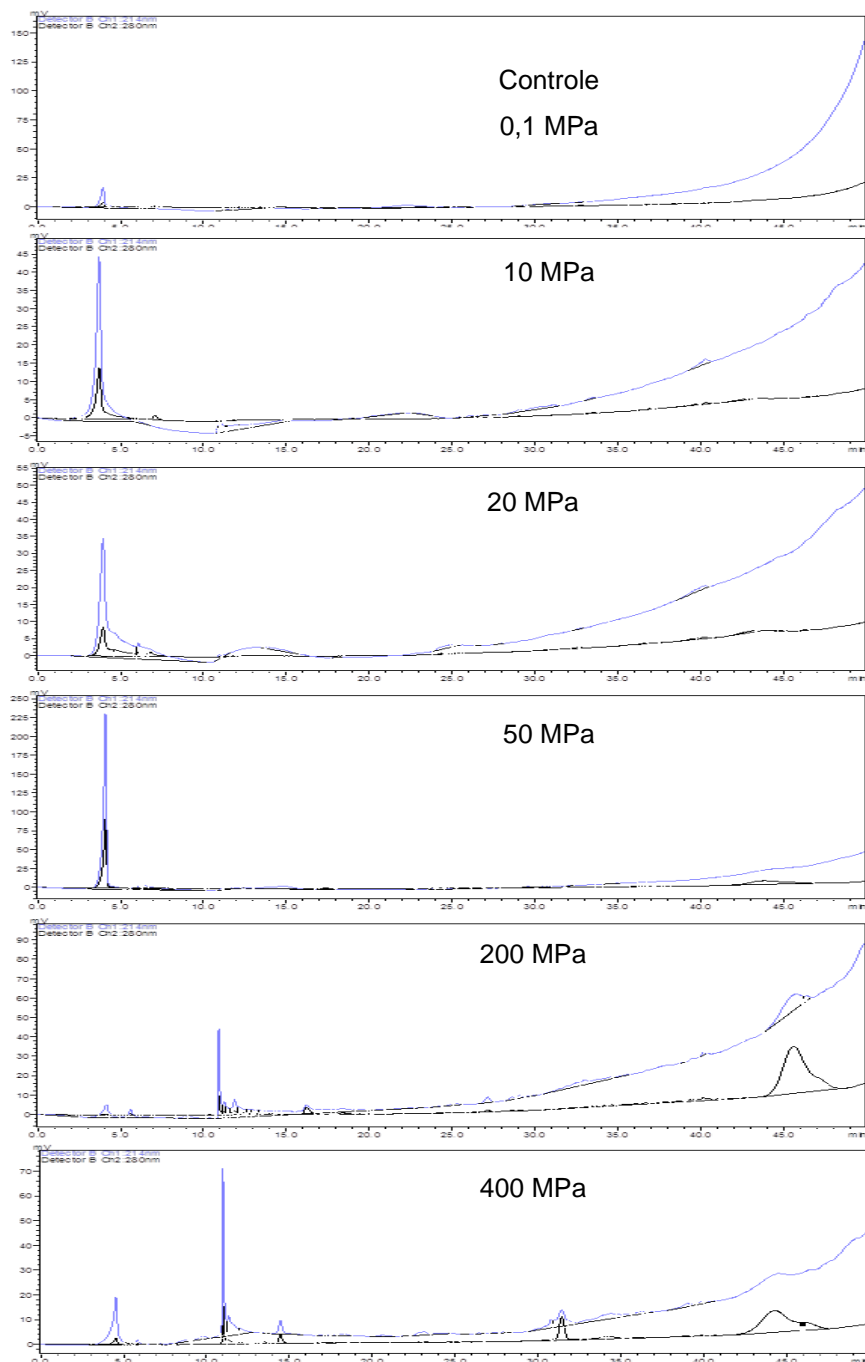


Figura 19. Perfil cromatográfico indicador da presença de proteínas e peptídeos das análises por HPLC, da água pressurizada a 0,1, 10, 20, 50, 200 e 400 MPa.

A presença de proteínas e peptídeos analisadas (figura 19) foi superior nas amostras submetidas ao estresse por HHP (10, 20, 50, 200 e 400 MPa) em relação ao grupo controle, submetido a pressão ambiente de 0,1 MPa (figura 19).

### 4.3.3 ANÁLISE DE FENOL

A determinação de proteínas e peptídeos seguiu protocolo que indica a presença de moléculas protéicas ao ajustar a detecção em UV no HPLC em 214 e 280 nm, sendo a confirmação, a presença de um pico em conjunto, tanto em 280 nm, quanto em 325 nm (figura 18).

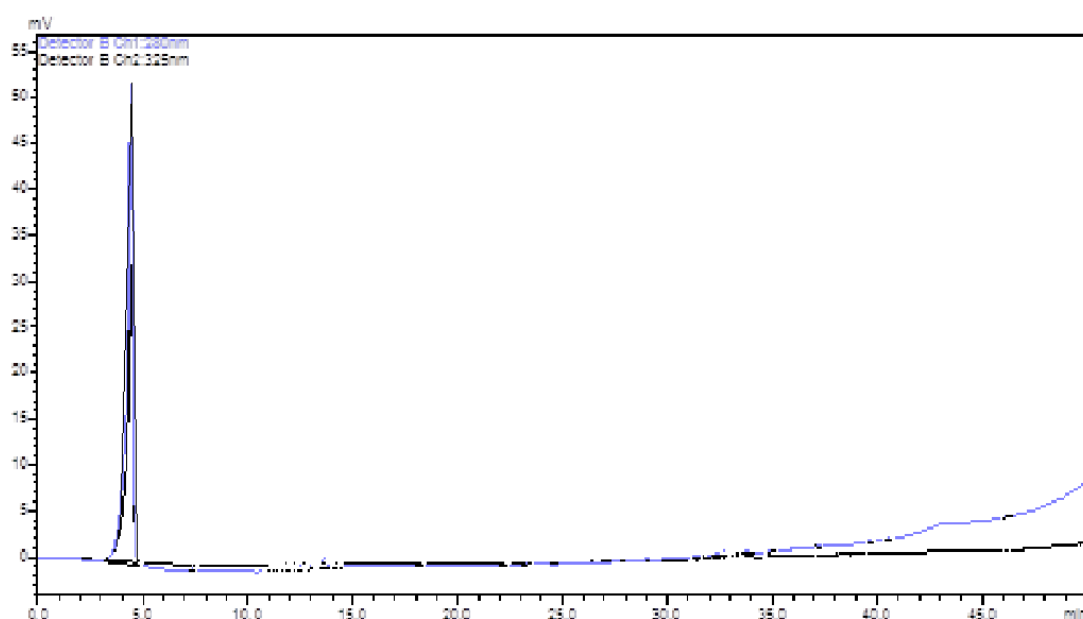


Figura 20. O perfil cromatográfico, da água pressurizada, após estresse com HHP, indica a presença, de fenol, quando comparado com o grupo controle de 0.1 MPa.

Os perfis cromatográficos (FIGURA 20) da análise apresenta diferenças entre uma amostra e grupo controle, apresentando o mesmo tempo de retenção.

#### 4.4 ANÁLISE DA ÁGUA DE PRESSURIZAÇÃO

A análise da água de pressurização identificou um extrato que pode ser utilizado para verificação de alterações ocasionadas pela HHP, provavelmente pela alteração que esse tipo de estresse abiótico causa na fluidez da membrana plasmática, alterando o fluxo e o influxo de moléculas.

A interferência da HHP sobre a solubilidade da membrana plasmática ainda é uma área que merece maiores estudos e esclarecimentos, pois a presença, na água pressurizada, de fitormônio, peptídeos e fenóis, nas corridas em HPLC, indica que é possível a verificação de alterações ocasionadas por esse tipo de estresse abiótico por esse extrato, indicando possivelmente um novo meio de estudo das possíveis alterações que a alta pressão hidrostática causa na fisiologia e no metabolismo das sementes de *Carica papaya*. As figuras (9 a 16) indicam alterações na composição da água de hidratação submetida a pressão por HHP, identificando fitormônios, proteínas, peptídeos e fenóis, a medida que as sementes de *Carica papaya* são submetidos a diferentes pressões po HHP.

Tais dados mostram a complexidade de mecanismo de ação do ABA e sua atuação, levando ao aparecimento da dormência.

A sarcotesta apresenta inibidores, principalmente compostos fenólicos, que acarretam germinação lenta e desuniforme das sementes. Assim, germinação satisfatória tem sido obtida quando a sarcotesta é removida (DAÍ TOKUHISA, 2007).

## 5 CONCLUSÃO

As sementes de *Carica papaya* apresentaram alteração na sua capacidade de hidratação e retenção hídrica, quando submetidas ao estresse por HHP, quando comparado ao grupo controle, a pressão ambiente.

As sementes submetidas ao estresse por HHP (50 MPa), apresentam quebra de dormência, caracterizado pela germinação antecipada a germinação do grupo controle.

As sementes apresentam maior capacidade de retenção hídrica quando submetidas a valores de estresse por HHP superior a 20 MPa, com limite máximo a 50 MPa.

A capacidade de hidratação aumentada em consequência ao estresse por HHP, reflete na germinabilidade de forma positiva até os valores de 10, 20 e 50 MPa, e de forma negativa nos valores de 200 e 400 MPa.

O estresse por HHP, mostrou-se eficaz como ferramenta biotecnológica em busca de novos mecanismos de estímulo sobre sementes de *Carica papaya* a fim de proporcionar melhora sobre germinação e proporcionar quebra de dormência.

A água de pressurização originada pelo experimento por HHP mostra-se eficiente como exemplo de meio para análise de moléculas em HPLC.

As sementes submetidas a HHP apresentam comportamento modificado, sobre os mecanismos inibidores de germinação, onde moléculas como ABA, proteínas, peptídeos e fenol, moléculas detectáveis via HPLC, na água de transferência de pressão, existente na cápsula de pressurização, apresentam tal característica, a resposta germinativa está estimulada e a presença dessas moléculas indicam alteração de sua concentração.

O fluido utilizado como mecanismo de transporte da pressão, apresenta-se como opção para demonstração de estudos qualitativos de moléculas como ABA, proteínas, peptídeos e fenol.



Os aspectos tecnicamente exigidos para a alta produtividade e qualidade apontam para a importância de investimentos de pesquisas em biotecnologia.

A hidratação de sementes permite a ativação de processos celulares mediados pela relação entre ABA e GA. O ABA e as AGs atuam de modo inverso no controle da síntese de enzimas envolvidas na degradação das paredes celulares do endosperma, o estresse por HHP, interfere na relação entre esses, de modo a estimular a germinação precoce, evidenciado pelo aumento de concentração de ácido abscísico no fluido de transferência de pressão, analisado por HPLC, diminuindo sua ação inibitória sobre AGs.

## 6 ANEXOS

### ANEXO 1 - Protocolo para germinação de Sementes *Carica papaya* (GV Golden)

- Autoclavar placas de petri, Ágar 1%, 3 espátulas, H<sub>2</sub>O destilada, 2 peneiras

1 – Para retirar Sarcotesta: colocar as sementes sadias e doentes em placas de petri autoclavadas separadas:

- Embeber em água destilada por 30 minutos

- Retirar sarcotesta com auxílio de espátula e transferir as sementes para outra placa autoclavada e seca.

- Após todas sementes estarem sem sarcotesta transferir da placa para peneira autoclavada

2 – Manter as sementes em água correntes por 1 hora e 30 minutos

3-Aplicar Pressão (alteração 15 de março de 2012)

#### NO FLUXO LAMINAR

3 – Esterelizar as sementes em álcool 70% em placa de petri autoclavada por 10 segundos

4 – Sanitizar em NaOCl 2% por 10 minutos (água sanitária comum)

5 – Lavar as sementes 3 vezes em água destilada autoclavada

6 – Embeber por 1 hora em água destilada autoclavada

7 – Em capela de fluxo laminar, esterilizar algodão em UV por 2 vezes

8 – Após esterilização, embeber o algodão em água destilada autoclavada

9 – Por o algodão em placa de petri autoclavada ou em tubo de ensaio autoclavado

10 – Distribuir as sementes nas placas ou nos tubos e colocá-las para germinar em estufa a 30° C por 8 horas no claro e 20° C por 16 horas no escuro

11 – Passar parafilm para fechar as placas

PARA TRABALHAR NO FLUXO LAMINAR

- limpar o fluxo com álcool 70 % e algodão

- ligar UV por 15 minutos

- desligar o UV

- ligar luz branca e o ventilador

## ANEXO 2 - Protocolo de extração de ABA em HPLC

### Padrão ABA

1 mg / 1ml

- 1) Ligando o HPLC
- 2) Coluna – C 18, fase reversa
- 3) Configuração:

Tempo 30 minutos

Fluxo: 1,5 ml/min

Low pressure gradiente: Solv. B = 0,0%, solv C = 20%, solv. D = 0,0%

Pressão = 30 MPa

Detectores

Detector A = desligado

Detector B = ligado – 250 nm

Detector C = ligado – 350 nm

Resultado – pico em 14,5 minutos com 250 nm

## ANEXO 3

**ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>**

**Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/07/2012**

=====

==

**Arquivo Ganho de persoanalizado Data 01/10/2012 Hora 12:08:50**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0.89525	0.14921	234.7091 **
Resíduo	35	0.02225	0.00064	
Total	41	0.91750		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
6	35	3.3692	234.7091	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	2.49667	e
2	2.54833	d
3	2.75167	c
4	2.84000	b

5	2.95333	a
6	2.71667	c
7	2.71167	c

-----

dms = 0.04550

MG = 2.71690

CV% = 0.93

Ponto médio = 2.71500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

#### DADOS

-----

2.50	2.45	2.52	2.48	2.53	2.50
2.52	2.57	2.51	2.56	2.58	2.55
2.75	2.74	2.76	2.77	2.74	2.75
2.85	2.87	2.82	2.81	2.87	2.82
2.95	2.94	2.93	2.96	2.98	2.96
2.68	2.67	2.72	2.77	2.74	2.72
2.72	2.71	2.74	2.71	2.70	2.69

-----

#### SIGLAS E ABREVIações

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

## REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

# Arquivo Alan germiação a Pressão Hidrostática de 0.1HPH

Data 08/10/2012 Hora 11:22:57

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

### QUADRO DE ANÁLISE

-----

FV GL SQ QM F

-----

Tratamentos 3 22488.50000 7496.16667 16063.2143 \*\*

Resíduo 20 9.33333 0.46667

-----

Total 23 22497.83333

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL GLR F-crit F p

3 20 4.9382 16063.2143 <0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----



1 0.00000 c

2 0.00000 c

3 59.33333 b

4 63.00000 a

-----

dms = 1.10439

MG = 30.58333 CV% = 2.23

Ponto médio = 32.50000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----

0 0 0 0 0 0

0 0 0 0 0 0

60 59 58 59 60 60

63 63 62 62 63 65

-----

SIGLAS E ABREVIações

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components

Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD

CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American

Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of

The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando:

American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006.

p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa

computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1,

p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance.

In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6,

Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural

Engineers, 1996. p.294-298.

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

**Arquivo Análise de germinação em sementes de Carica papaya após aplicação de 10MPa Data 08/10/2012 Hora 11:29:37**

## **EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO**

### QUADRO DE ANÁLISE

-----

FV GL SQ QM F

-----

Tratamentos 3 18148.12500 6049.37500 4871.9799 \*\*

Resíduo 20 24.83333 1.24167

-----

Total 23 18172.95833

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL GLR F-crit F p

3 20 4.9382 4871.9799 <0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----

1 0.00000 d

2 31.00000 c

3 64.83334 b

4 67.00000 a

-----

dms = 1.80145

MG = 40.70833 CV% = 2.74

Ponto médio = 34.50000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----

0 0 0 0 0 0

30 32 32 29 31 32

65 64 66 65 63 66

67 66 67 68 65 69

-----

SIGLAS E ABREVIações

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components

Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD

CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American

Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of

The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando:

American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006.

p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa

computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1,

p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance.

In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6,

Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural

Engineers, 1996. p.294-298.

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

**Arquivo Germinação após aplicação de pressão de 20 MPa com análise de 02, 04, 07 Data 08/10/2012 Hora 11:36:36**

## **EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO**

### QUADRO DE ANÁLISE

-----

FV GL SQ QM F

-----

Tratamentos 3 21118.33333 7039.44444 4445.9649 \*\*

Resíduo 20 31.66667 1.58333

-----

Total 23 21150.00000

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL GLR F-crit F p

3 20 4.9382 4445.9649 <0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----

1 0.00000 d



2 33.83333 c

3 68.50000 b

4 73.66666 a

-----

dms = 2.03426

MG = 44.00000 CV% = 2.86

Ponto médio = 38.00000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----

0 0 0 0 0 0

32 33 34 33 35 36

69 67 68 68 69 70

71 73 74 73 75 76

-----

SIGLAS E ABREVIações

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components

Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD

CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American

Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of

The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando:

American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006.

p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa

computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1,

p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance.

In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6,

Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural

Engineers, 1996. p.294-298.

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

**Arquivo Germinação com 50 MPa Data 08/10/2012 Hora 11:40:20**

## **EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO**

### QUADRO DE ANÁLISE

-----

FV GL SQ QM F

-----

Tratamentos 3 10980.79167 3660.26389 600.8641 \*\*

Resíduo 20 121.83333 6.09167

-----

Total 23 11102.62500

-----

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL GLR F-crit F p

3 20 4.9382 600.8641 <0.001

### MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

-----

1 32.66667 c

2 52.83333 b

3 81.16666 a

4 84.83334 a

-----

dms = 3.99014

MG = 62.87500 CV% = 3.93

Ponto médio = 57.50000

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

-----

30 33 29 34 35 35

56 57 55 48 49 52

81 82 83 80 79 82

86 85 86 85 83 84

-----

SIGLAS E ABREVIações

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components

Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD

CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American

Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of

The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando:

American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006.

p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa

computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1,

p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance.

In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6,

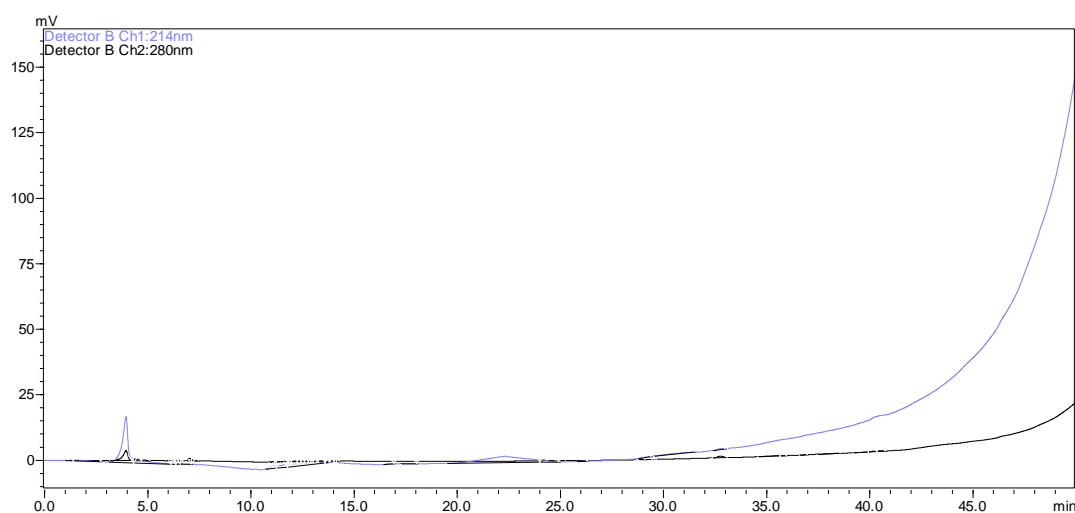
Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural

Engineers, 1996. p.294-298.

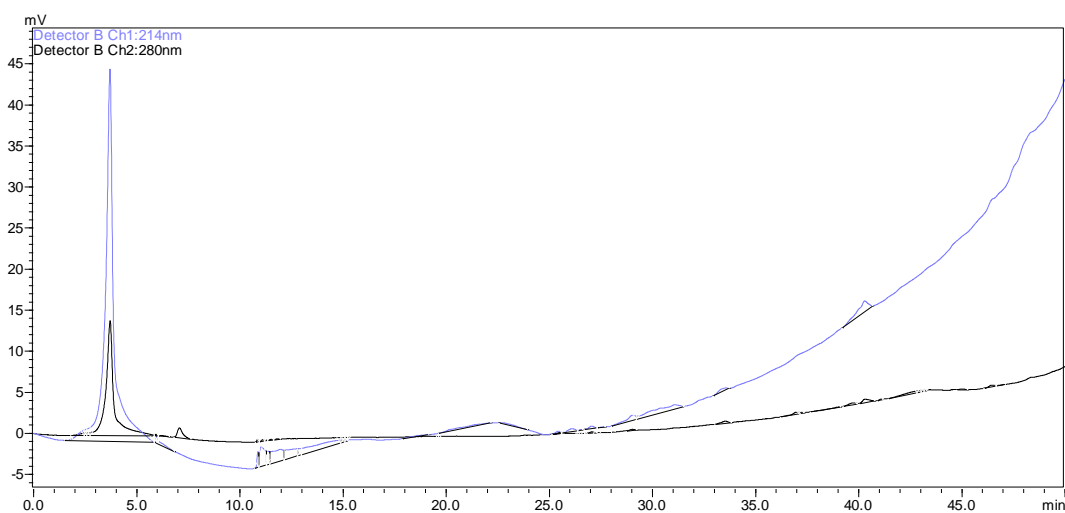
OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

ANEXO 4 – Corridas cromatográficas em HPLC, para confirmação da presença de proteínas e peptídeos, com detector em UV, com comprimento de onda regulado para 124 /280 nm.

**1 – Cromatógrafo do grupo controle, 0.1 Mpa**

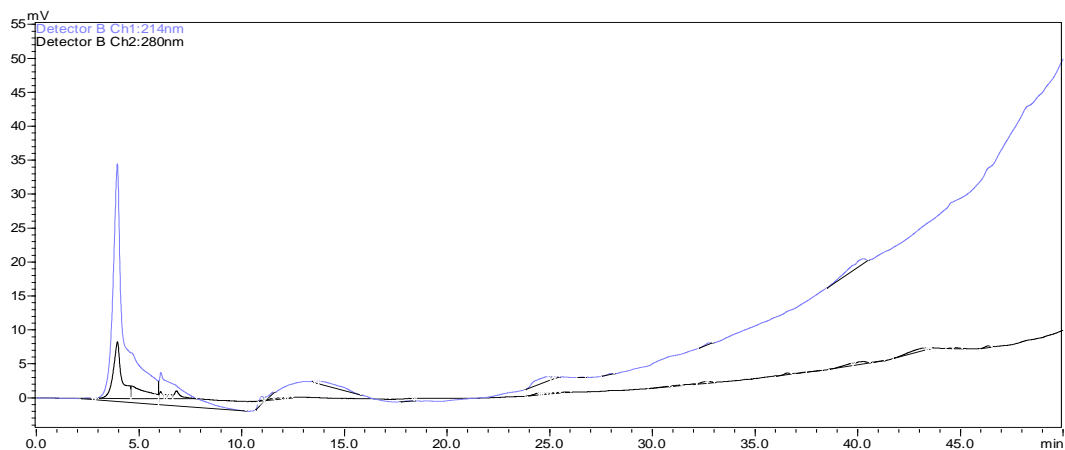


**2 – Cromatógrafo do lote correspondente as sementes submetidas a 10 MPa**

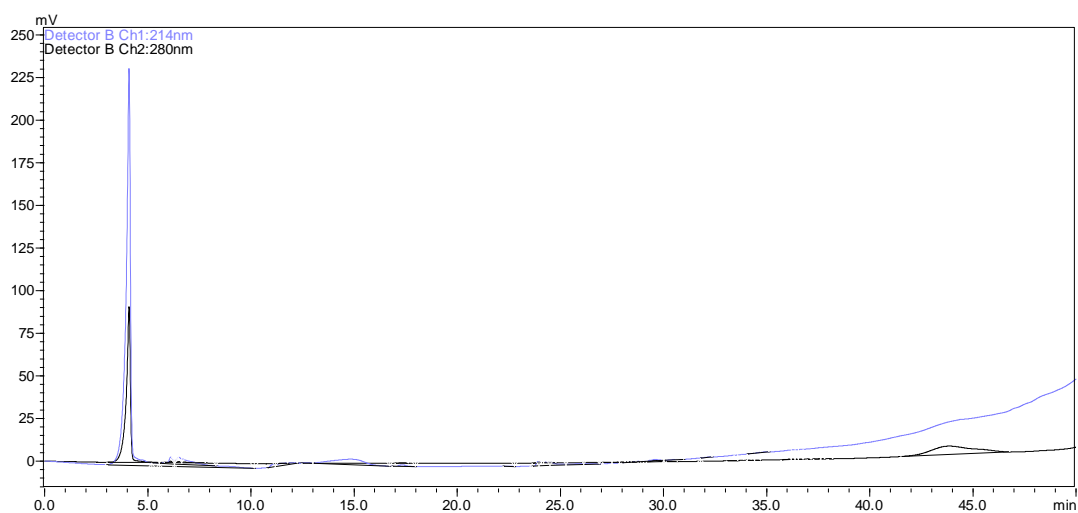


**3 – Cromatógrafo do lote correspondente as sementes submetidas a 20 MPa**

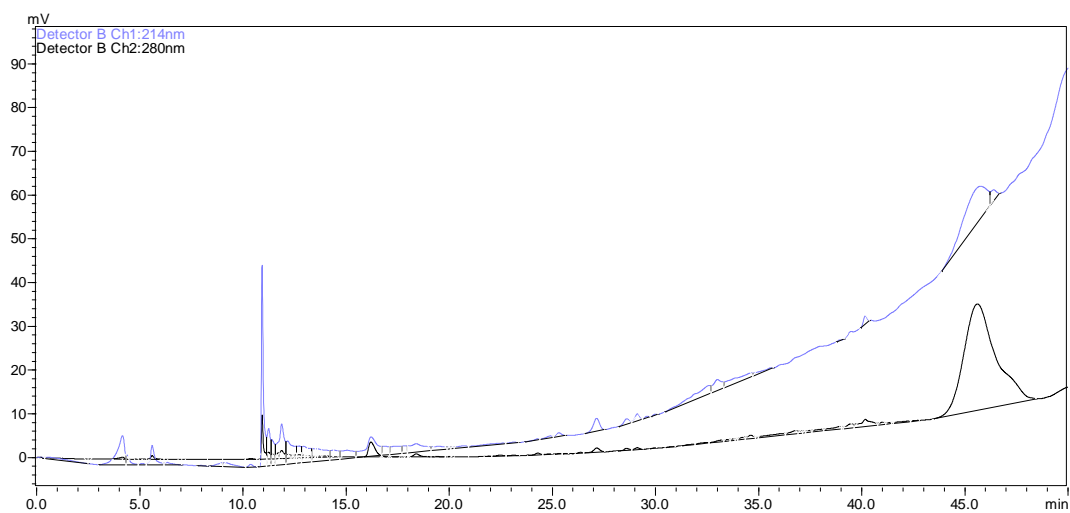




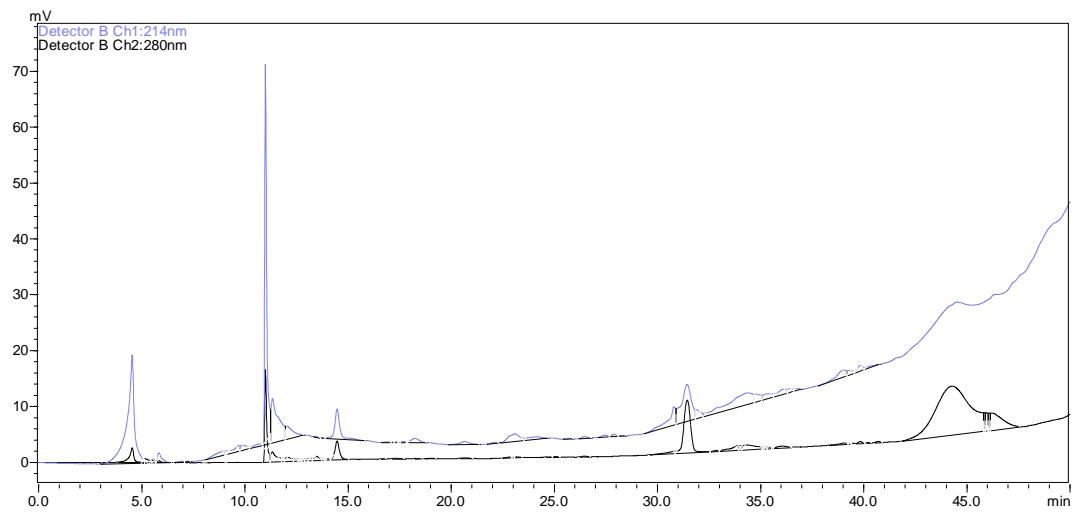
#### 4 – Cromatógrafo do lote correspondente as sementes submetidas a 50 MPa



#### 5 – Cromatógrafo do lote correspondente as sementes submetidas a 200 MPa



#### 6 – Cromatógrafo do lote correspondente as sementes submetidas a 400 MPa



## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABREU, P. M. V. Pesquisa Biotecnológica na Fruticultura. 2011.

AGUERO, J. P.; VIEIRA, R. D.; BITTENCOURT, S. R. M. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 19, n. 2, p. 254-259, 1997.

AGUILAR, Marie-Isabel. **HPLC of Peptides and Proteins**. Springer New York, 2004.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2006. Santa Cruz do Sul. Ed. Gazeta Santa Cruz, 2006. 136p.

ALPERT, P.; OLIVER, M. J. Drying without dying. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CAB International, 2002. p. 4-43.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15ed. Arlington: AOAC, 1990. 684p.

ARANTES, H. A. G. et al. Espessura do tegumento, embebição em água e qualidade fisiológica da semente de soja (*Glycinemax*(L.) Merrill). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 41, n.234, p. 126-132, 1994.

ARMSTRONG, H.; McDONALD, M. B. Effects of osmoconditioning on water uptake and electrical conductivity in soybean seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 20, p.391-400, 1992.

ÁVILA, M. R. et al. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 29, n. 3, p.111-127, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Gazeta: Santa Cruz do Sul, RS. 2010, 129 p.

BANG, W. S.; CHUNG, H. J. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. **N Biotechnol**, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2010.

BEZERRA, A.M.E.; MEDEIROS FILHO, S.; BRUNO, R.L.A.; MOMENTÉ, V.G. Efeito da pré-embebição e aplicação de ácido giberélico na germinação de sementes de macela. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, p.185-190. 2006.

BARBOSA-CANOVAS, G.V., M.M. Gongora-Nieto, U.R. Pothakamury and B.G. Swanson, 1997. Preservation of Food with Pulsed Electric Fields. **Academic Press**, London.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A.G.; 2004

COSTA, J. A. et al. Variedades de soja diferem na velocidade e capacidade de absorver água. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 3, n. 1-2, p. 91-96, 2002.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. **New York: Plenum Press**, 1994. 445p.

BEWLEY, J.D.; HEMPEL, F.D.; McCORMICK, S.; ZAMBRYSKI, P. Reproductive Development. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Phytologist, **Rockville**. 2000, p. 988-1043.

BRAVIM F; PALHANO, FL, FERNANDES, AA; FERNANDES, PM. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, n. 10, p.1071-9, 2010.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, 218:443-448, 1982.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2 ed. **New York: Plenum**, 1994, 445p.

BENJAPHOKEE, S., HASEGAWA, D., YOKOTA, D., et al. (2012). Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress

tolerance to high temperature, acid and ethanol. **New biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 379–386.

BRADFORD, K.J. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science, Madison**, v.34, p.1-11, 1994.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.). Sementes florestais tropicais. Brasília: **ABRATES**, 1993. 350p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. New York: **Plenum Press**, 1994. 445p.

COSTA, J. A. et al. Variedades de soja diferem na velocidade e capacidade de absorver água. *ScientiaAgraria*, Curitiba, v. 3, n. 1-2, p. 91-96, 2002.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

COPELAND, L.O.; MacDONALD, M.B. Principles of seed science and technology. 3 ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 409p.

CHIWOCHA, S.; VON ADERKAS, P. Endogenous levels of free and conjugated forms of auxin, cytokinins and abscisic acid during seed development in Douglas fir. **Plant Growth Regulation, Dordrecht**, v. 36, p. 191-200. 2002

CHACKO, E.K, SINGH, R.N. The effect of gibberellic acid on the germination of papaya seeds and subsequent seedling growth. **Tropical Agricola**, Trinidad, v. 43, p. 341 - 346. 1966.

CHOW, Y..J.; LIN, C. H. p - Hydroxybenzoic acid as the major phenolic germination inhibitor of papaya seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, n. 19, 167- 174. 1991.

DAÍ TOKUJISA, Denise Cunha Fernandes dos; SANTOS DIAS, Eveline Mantovani Alvarenga; CÊSAR HILST, Antônio JacintoDemuner. COMPOSTOS FENÓLICOS

INIBIDORES DA GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 161-168, 2007.

DE ALMEIDA GUIMARÃES, Marcelo; DOS SANTOS DIAS, Denise Cunha Fernandes; LOUREIRO, Marcelo Ehlers. Hidratação de sementes. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 1, p. 31, 2008.

DE ASSUMPÇÃO, Teresa Cristina França. **Diversidade Molecular e Funcional de Proteínas da Saliva de Triatoma infestans, um vetor da Doença de Chagas**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília.

DE MELO, Anieli Pilar Campos et al. Superação de dormência de sementes e crescimento inicial de plântulas de umbuzeiro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1343-1350, 2012.

EIRA, M.T.S. **Condicionamento osmótico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.): efeitos sobre a germinação e desempenho sob estresse hídrico, salino, térmico**. 1988. 90p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FAGUNDES, G. R.; YAMANISHI, O. K. Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo 'solo' comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília-DF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, 2001.

FERNANDES, P. M.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett Appl Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 42-6, jan 2001.

FERNANDES, P. et al. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS letters**, v. 556, n. 1, p. 153-160, 2004. FERREIRA, A. G; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 135-148.

FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **Acta Amazônica**, vol.36, p.141-146. 2006.

FERREIRA, E. H. R.; MASSON, L. M. P.; ROSENTHAL, A. Efeito da Alta Pressão Hidrostática nos Microrganismos. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 135-150, 2008.

FARKAS, D.; HOOVER, D. High pressure processing. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. **Journal of Food Science Supplement**, p. 47-64, 2000.

FOUNTAIN, D.W.; BEWLEY, J.D. Lettuce seed germination. Modulation of pre-germination protein synthesis by gibberellic acid, and cytokine. **Plant Physiology**, v.58, p.530-536. 2001.

FLOWERS, T.; KOYAMA, M.; FLOWERS, S.; SUDHAKAR, C.; SINGH K.; YEO A. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, 51:99-106, 2000.

GASH, A.P., SPELLMANN, P.T., KAO, C.M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M.B., STORZ, D., BOTSTEIN, D. and BROWN, O.P.(2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol. Cell Biol.** 11, 4241-4257.

HMIDA-SAYARI, A.; BIUZID, R.G.; BIDONI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, 169:746-752, 2005.

HESS, J.R.; CARMAN, J.G.; BONOWETZ, G.M. Hormones in wheat kernels during embryony. **Journal of Plant Physiology, Heidelberg**, v. 159, p. 379-386. 2002.

JACOMINO, A.P.; OJEDA, R.M.; KLUGER, A.; SCARPARE FILHO, J.A. Conservação de goiabas tratadas com emulsões de cera de carnaúba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p. 401-405, Dez. 2003.

JACOMINO, A. P.; BRON, L. U.; KLUGE, R. A. Avanços em tecnologia pós-colheita de mamão. In: MARTINS, D. S. **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: INCAPER, 2003. p. 283-293.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell and Environment**, 25:275–294. 2002.

LORENZ, K.; Cereal sprouts, composition nutritive value food. Crit. **Rev. Food Sci. Nutri. Publi. Med. Result**, 1980.

NEHMI, I. M. D.; FERRAZ, J. V.; NEHMI FILHO, A. SILVA, M. L. (Coords). **AGRIANUAL 2005: Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: **Argos Comunicação**, 2003. p.210-211. (AGRIANUAL, 2006).

NOLWENNIG R.; JEAN R., DEMAZEAU G.. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies, Journal: **Biotechnology Advances - BIOTECHNOL ADV** , vol. 28, no. 6, pp. 659-672, 2010

MENTRÉ, P., HAMRAOUI, L., HUI BON HOA, G., DEBEY, P..Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy.**Cell MolBiol (Noisy-le-grand)**, v. 45, n. 3, p. 353-62, 1999.

MARTINS, D.S.; COSTA, A. de F. *A cultura do mamoeiro: tecnologia de produção*. Vitória: **INCAPER**, 2003. 497 p.

MARTINS, D. dos S.; PAULA, R. de C. A. L. de; CARVALHO, R. C. Z.; ROCHA, M. A. M. Espécies e hospedeiros de afídeos associados à cultura do mamão (*Caricapapaya*L.) no norte do estado do Espírito Santo. In: MARTINS, D. dos S. (ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória-ES: Incaper, 2005. p.447-452.



MATHEUS, M. T.; GUIMARÃES, R. M.; BACELAR, M.; OLIVEIRA, S. A. S. Superação da dormência em sementes de duas espécies de *Erythrina*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 48-50 53, 2010.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER. The germination of seeds. 3.ed. N. York: **Pergamon Press**, 1989. 236p.

METIVIER, J.R. 1979. Dormência e germinação. *In*: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. Vol. 2. Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 342-392.

MOLINA-GARCIA, A.D., SANZ, P.D.. Anisakis simplex larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. **J.Food Prot.**, v. 65, p. 383–388, 2002.

MARIN, S.L.D.; GOMES, J.A.; SALGADO, J.S.; MARTINS, D.S.; FULLIN, E.A. *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo*. 4.ed. Vitória: **EMCAPA**, 1995. 57 p. (Circular Técnica, 3)

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SCIVITTARO, W.B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A Lavoura**, Rio de POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, 1985. 209p.

ORTIZ, Luz Yineth; FLÓREZ, Víctor Julio. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas en la tuberización de Solanum tuberosum L. y Solanum phureja Juz et Buk. **Agron. Colomb**, v. 26, n. 1, p. 32-39, 2008.

REYES, M. C., TAUC, P., BROCHON, J.C.. Pressure effects on the physical properties of lipid bilayers detected by trans-parinaric acid fluorescence decay. **Biophys J.**, v. 65. n.5, p. 2248–2260, 1993.

REYES, M.N, PEREZ, A., CUERVAS, J. Detecting endogenous growth regulators on the sarcotesta, sclerotesta, endosperm and embryo by paper chromatography on fresh and old seeds of two papaya varieties. **Journal Agricultural University**, Puerto Rico , v. 64, p.164 - 172. 1980.

RODRIGUES, Maria Benta Cassetari et al. Pré-hidratação em sementes de soja e eficiência do teste de condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 168-181, 2006.

ROCK, C.D.; QUATRANO, R.S. The role of hormones during seed development. In: Davies PJ. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer **Academic Publishers**, 1995. p. 671-697.

ROSSETTO, CAV et al. Comportamento das sementes de soja durante a fase inicial do processo de germinação. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1-2, p. 106-115, 1997.

SALLANDROUZE, A.; FAUROBERT, M.; MAËTAOUI, M.E. Characterization of the development stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. **Physiologia Plantarum, Edinburgh**, v. 114, p. 608-618. 2002.

SANCHES, N.F.; DANTAS, J.L.L. *O cultivo do mamão*. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 1999. 105 p. (Circular Técnica, 34).

SATILMIS; SENCER, 2011, Use of genetic algorithms for high hydrostatic pressure inactivation of microorganisms Kocaeli University, 41650 **Kocaeli**, Turkey, September, 2011

SERRANO, L.A.L.; CATTANEO, L.F.O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.3, 2010. Texto de capa.

SHIGA, T.M.; FABI, J.P.; NASCIMENTO, J.R.O.; MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering aspects of highpressure technology in the food industry. **Food Technology, Chicago**, v. 47, n .6, p. 164-169, 1993.

SHEARER, A. E.; KNIEL, K. E. High hydrostatic pressure for development of vaccines. **J Food Prot**, v. 72, n. 7, p. 1500-1508, jul 2009.

SILVA, R. O. et al (2011), Simpósio do Papaya Brasileiro, 5., 2011, Porto Seguro. Inovação e sustentabilidade: anais. Porto Seguro: **Embrapa Mandioca e Fruticultura** 2011.

SILVA, L.M.; LEMOS, L.B.; CRUSCIOL, C.A.C.; MATEUS, G.P.; FELTRAN, J.C. Eficiência de utilização de nutrientes em cultivares de feijão em razão da calagem. **Revista de Agricultura**, v.82, p.184-196, 2007

SHEARER AEH, KNIEL KE. High hydrostatic pressure for development of vaccines. **J Food Prot** 2009;72:1500–8.

SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, Irlanda do Norte, n. 9, p. 152-158, 1998.

SOUZA, Eliziete Pereira de; SILVA, Ivandro de França da; FERREIRA, Leonardo Elias. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA A ESTRESSES POR METAIS PESADOS EM PLANTAS. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720p  
Jiang M, Zhang J (2002) Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. **Planta** 215, 1022–1030

TING, E.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; RAGHUBEER, Errol. Determining Thermal Effects in High-Pressure Preocessing. **Food Technology Feature**, New Orleans, v. 56, n. 2, p. 31-34, 2002.

VIGGIANO, J.R, SILVA, R.F, VIEIRA, H.D. Ocorrência de dormência em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Sementes Online**, Pelotas , v.1, p.6 - 10. 2000.

VILLELA, F.A. Water relations in seed biology. **Scientia Agricola**, v.55, p. 98-101. 1998.

VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley, United States of America. 2004. 1591p.

WINTER R, JEWORREK C. Effect of pressure on membranes. **Soft Matter**, v. 5, p. 3157-3172, mai 2009

YALDAGARD M.; MORTAZAVI, S.A.; TABATABAIE, F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation. **African J Biotechnol**, Vol. 7, n. 16, p. 2739-2767, ago 2008

YUSTE, J.; MOR-MUR, M.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B.; PLA, R. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. **FoodMicrobiology**, Barcelona, v. 15, p. 407-414, 1998.